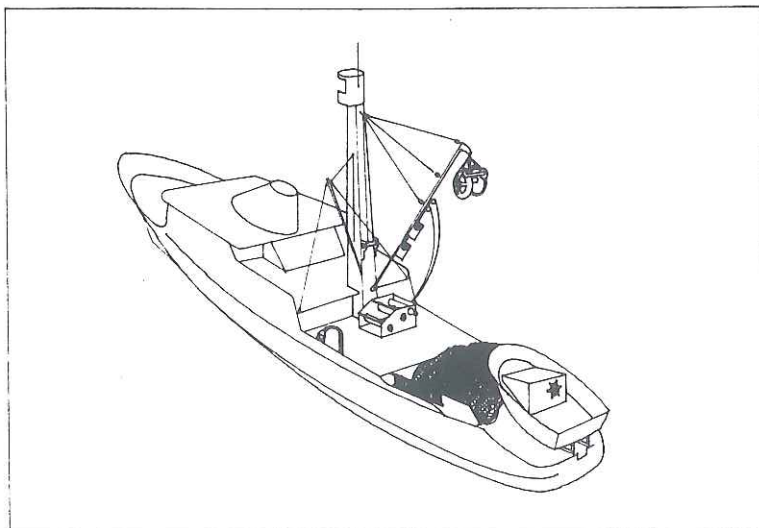


## DOSAGE RAPIDE DE L'HISTAMINE DANS LE THON MISE AU POINT – OPTIMISATION – APPLICATIONS

Nelly BREGEON



SEPTEMBRE 1992

DRV/VP - 93/08

INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

Adresse :  
  
IFREMER  
155, Rue Jean-Jacques ROUSSEAU  
92138 ISSY-LES-MOULINEAUX

DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES

DEPARTEMENT  
VALORISATION DES PRODUITS

<b>AUTEUR(s) :</b>  Nelly BREGEON	<b>CODE :</b>
<b>TITRE :</b>  Dosage rapide de l'histamine dans le thon : mise au point optimisation, application	<b>DATE :</b> <b>Tirage nb :</b>  Nb pages : 61 Nb figures : 39 + 49 Nb photos : 2
<b>Contrat (intitulé)</b>  N° PASEV VP/QP 12	<b>DIFFUSION</b>  Libre <input checked="" type="checkbox"/> Restreinte <input type="checkbox"/> Confidentielle <input type="checkbox"/>

**RESUME :**

Après une revue bibliographique de l'histamine dans le thon, l'auteur a, grâce à un outil mathématique puissant : les plans expérimentaux, mis au point une méthode rapide de dosage de l'histamine. La technique enzymatique utilisée qui nécessite un lecteur de plaques est ensuite validée, par comparaison à une méthode HPLC, considérée comme référence.

**ABSTRACT :**

After a bibliographic analysis about histamine in tuna and thanks to a high mathematical process - the experimental design method - the author has adjusted a quick proportioning method for histamine.

The enzymatic technique used in this case requires a microplates reader. It was afterwards validated by comparison with HPLC method considered as reference.

**mots clés :** Thon Histamine - Plans expérimentaux - Dosage enzymatique - Colorimètre - Test rapide.

**key words :** Tuna - Histamine - Experimental design method - Enzymatic analysis - Spectrophotometry - Quick test.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS

CENTRE REGIONAL ASSOCIE DE NANTES

---

MEMOIRE

présenté en vue d'obtenir

LE DIPLOME D'INGENIEUR C.N.A.M.

en

SCIENCES ET TECHNIQUES DES INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES

par

Nelly BREGEON

**DOSAGE RAPIDE DE L'HISTAMINE DANS LE THON**

**MISE AU POINT - OPTIMISATION - APPLICATIONS**

Les travaux relatifs au présent mémoire ont été effectués à l'Institut Français de  
Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) de Nantes.

Soutenu le 4 Novembre 1992

---

Jury : Président : M. DEMAIMAY

Membres :           Mme ETIENNE  
                          M. POTUS  
                          M. PEIGNE  
                          M. LOREAL

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie particulièrement Monsieur HAN-CHING, Directeur du Département "Transformation et Valorisation des Produits" de l'IFREMER, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et m'a permis de mener à bien ce projet.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Madame ETIENNE, responsable du laboratoire "Qualité et Physico-chimie", qui m'a proposé ce sujet de recherche, m'a encadrée et conseillée lors de cette étude.

Que Mesdames LUKOMSKA et LANDREIN, Messieurs ABADIE, JEROME et LIDDY soient assurés de ma reconnaissance pour leur disponibilité et l'aide qu'ils ont bien voulu m'accorder.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur COURCOUX, Informaticien-Statisticien à l'ENITIAA de Nantes, pour son encadrement dans l'approche mathématique de cette étude.

Mes remerciements vont également à Monsieur CADIOU, responsable micro du service informatique de l'IFREMER, pour sa contribution à la réalisation de l'outil informatique utilisé au cours de cette étude, ainsi qu'à Mesdames L'EXCELLENT et RADENAC, bibliothécaires de l'Ifremer, pour leur disponibilité et leur aide précieuse.

Je remercie chaleureusement tout le personnel du Département "Transformation et Valorisation des Produits", pour l'accueil sympathique qu'ils m'ont réservé durant cette année d'étude.

Que Monsieur SCHENKER, Directeur du Lycée Agricole de Loire-Atlantique, mon employeur, reçoive le témoignage de ma gratitude pour la souplesse d'organisation qu'il m'a consentie au cours de ces derniers mois.

A tous, Merci.

# SOMMAIRE

	Page
<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS</u></b>	
<b><u>PRESENTATION DE L'IFREMER</u></b>	
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	1
<b><u>PREMIERE PARTIE - TRAVAUX ANTERIEURS</u></b>	3
<b><u>I - STRUCTURE - FORMATION - ORIGINE DE L'HISTAMINE ET DES AMINES BIOGENES.</u></b>	3
1 - Structure chimique des amines biogènes et en particulier de l'histamine	3
2 - Mécanisme de formation des amines biogènes et en particulier de l'histamine	4
3 - Origine de l'histamine	5
3 - 1 - Facteurs intrinsèques	5
3 - 1 - 1 - Teneur en histidine libre dans l'aliment	
3 - 1 - 2 - Activité des enzymes tissulaires	
3 - 1 - 3 - Espèce animale	
3 - 2 - Facteurs extrinsèques	6
3 - 2 - 1 - Présence de bactéries à histidine décarboxylase	
3 - 2 - 2 - Conditions de pêche	
3 - 2 - 3 - Conditions de stockage	
<b><u>II - ASPECT TOXICOLOGIQUE</u></b>	8
1 - Symptomatologie	9
2 - Epidémiologie	9
3 - Géographie des syndromes histaminiques	10
4 - Pathologie	10
5 - Doses toxiques	12
6 - Thérapeutique	12
7 - Prophylaxie des intoxications	12
8 - Conclusion	13
<b><u>III - PRESENCE D'AMINES BIOGENES DANS LES ALIMENTS</u></b>	13
1 - Teneurs dans les aliments	13
2 - Influence des conditions de stockage sur la teneur en amines biogènes	14
3 - Réglementation	14

<b>IV - <u>METHODES DE DOSAGE DE L'HISTAMINE</u></b>	<b>16</b>
1 - Méthodes biologiques	16
2 - Méthodes chimiques	17
2 - 1 - Méthodes séparatives	17
2 - 1 - 1 - Chromatographie Couche Mince : CCM	
2 - 1 - 2 - Chromatographie d'échange d'ions	
2 - 1 - 3 - Chromatographie liquide haute performance : CLHP	
2 - 1 - 4 - Chromatographie phase gazeuse : CPG	
2 - 2 - Méthodes de visualisation	19
2 - 2 - 1 - Colorimétrie	
2 - 2 - 2 - Fluorimétrie	
3 - Méthodes biochimiques rapides	21
3 - 1 - Méthode enzymatique	
3 - 2 - Méthodes immunologiques	
4 - Autres méthodes	21
5 - Conclusion	21
<b>DEUXIEME PARTIE - <u>DOSAGE ENZYMATIQUE RAPIDE DE L'HISTAMINE</u></b>	<b>23</b>
<b>I - <u>MATERIEL</u></b>	<b>23</b>
1 - Matériel biologique	23
1 - 1 - Composition biochimique du poisson	
1 - 2 - Evolution <i>post mortem</i> du système musculaire	
1 - 3 - Matériel biologique	
2 - Matériel scientifique	25
3 - Réactifs	26
<b>II - <u>OPTIMISATION DU DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'HISTAMINE</u></b>	<b>27</b>
1 - Principe du dosage	27
2 - Cinétique de la réaction enzymatique	27
3 - Etude bibliographique du système enzymatique	28
4 - Dosage enzymo-colorimétrique	30
4 - 1 - Paramètres instrumentaux	30
4 - 1 - 1 - Volume des réactifs - Ordre d'incorporation	
4 - 1 - 2 - Trajet optique	
4 - 1 - 3 - Longueur d'onde	
4 - 2 - Paramètres analytiques	31

4 – 3 – Optimisation de l'extraction	32
4 – 3 – 1 – Extraction à l'eau	
4 – 3 – 2 – Extraction au TCA	
4 – 3 – 3 – Extraction au tampon	
4 – 3 – 4 – Bilan des différents essais d'extraction testés	
4 – 3 – 5 – Mise en évidence des protéines extraites	
4 – 3 – 6 – Précipitation des protéines	
4 – 3 – 7 – Electrophorèse	
4 – 3 – 8 – Discussion – Méthode retenue	
4 – 3 – 9 – Vérification de l'extraction	
4 – 3 – 10 – Conclusion	
4 – 4 – Gamme étalon de substrat	38
4 – 5 – Optimisation du dosage enzymo-colorimétrique	39
4 – 5 – 1 – Principe de la méthode des plans d'expériences	
4 – 5 – 2 – Démarche et Méthodologie	
4 – 5 – 2 – 1 – Choix des paramètres à tester	
4 – 5 – 2 – 2 – Choix de la réponse expérimentale	
4 – 5 – 2 – 3 – Facteurs non contrôlés	
4 – 5 – 2 – 4 – Choix du modèle	
4 – 5 – 2 – 5 – Choix du plan	
4 – 5 – 2 – 6 – Détermination de l'erreur expérimentale	
4 – 5 – 3 – Mise en application – Résultats	
4 – 5 – 3 – 1 – Construction du plan factoriel fractionnaire	
4 – 5 – 3 – 2 – Domaine expérimental	
4 – 5 – 3 – 3 – Résultats du plan factoriel fractionnaire	
4 – 5 – 3 – 4 – Optimisation du modèle	
4 – 5 – 3 – 5 – Résultats du plan central composite	
4 – 5 – 4 – Conclusion	
<b>TROISIEME PARTIE – <u>RESULTATS – DISCUSSION</u></b>	<b>51</b>
<b>I – <u>METHODE RETENUE</u></b>	<b>51</b>
<b>II – <u>VALIDATION : COMPARAISON CLHP</u></b>	<b>51</b>
<b>III – <u>CRITERE DE FIABILITE</u></b>	<b>52</b>
1 – Domaine d'application	52
2 – Limite de détection	52
3 – Spécificité et Sélectivité	53
4 – Précision	54
4 – 1 – Répétabilité	
4 – 2 – Reproductibilité	
5 – Sensibilité	55
6 – Conclusion	55

<b><u>IV - PRATICABILITE</u></b>	<b>56</b>
<b><u>V - ETUDE ECONOMIQUE</u></b>	<b>56</b>
<b><u>VI - EXTENSION DE LA METHODE</u></b>	<b>57</b>
<b>1 - Présentatin et utilisation des réactifs</b>	<b>57</b>
<b>1 - 1 - Mélange des réactifs</b>	
<b>1 - 2 - Lyophilisation des réactifs</b>	
<b>1 - 3 - Nouveautés</b>	
<b>2 - Appareillage</b>	<b>59</b>
<b>3 - Conclusion</b>	<b>59</b>
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>60</b>
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	
<b><u>ANNEXES</u></b>	
<b><u>INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX</u></b>	



## LISTE DES ABREVIATIONS

**ABVT** : Azote Basique Volatil Total.

**AOAC** : Association of Official Analytical Chemists.

**ATP** : Adénosine Tri Phosphate.

**CCM** : Chromatographie Couche Mince.

**CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance.

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.

**DASS** : Direction des Affaires Sanitaires et Sociales.

**DNFB** : 2-4-Dinitrofluorobenzène.

**DSV** : Direction des Services Vétérinaires.

**FAO** : Food and Agriculture Organization of United Nations.

**FIOM** : Fond d'Intervention et d'Organisation pour la pêche Maritime.

**HRP** : Horse Radish Peroxydase (Peroxydase de raifort).

**LCV** : Leuco Cristal Violet.

**OPT** : Orthophtalaldéhyde (également appelée OPA).

**OCDE** : Organisation Coopérative de Développement Economique.

**PCC** : Plan Central Composite.

**PDAO** : Diamine Oxydase de Porc.

**PFC** : Plan Factoriel Complet.

**PFF** : Plan Factoriel Fractionnaire.

**Rf** : Front de rétention.

**TCA** : Acide Trichloracétique.

**SECODIP** : Société d'Etudes de la Consommation, Distribution et Publicité.

## PRESENTATION DE L'IFREMER

Historiquement, l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) est issu de la fusion du Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO) et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM).

Aujourd'hui, il s'agit d'un Etablissement de recherche Public à caractère Industriel et Commercial (EPIC), placé sous la double tutelle du Ministère de la Recherche et de la Technologie et du Ministère de la Mer.

Principalement représenté par cinq centres (Boulogne-sur-mer, Brest, Nantes, Toulon et Papetee), l'Ifremer compte aujourd'hui vingt trois stations ou délégations réparties le long du littoral français ou en outre-mer. Son siège social est implanté à Issy-les-Moulineaux.

Ses missions et ses compétences sont vastes, mais surtout orientées vers la recherche, en matière :

- de valorisation des produits de la mer et des biotechnologies marines,
- de connaissance, de surveillance et de protection de l'environnement,
- d'étude de l'océan et de changement global du climat,
- d'intervention sous-marine et d'instrumentation,
- de suivi des ressources de la mer, principalement de la pêche et de la conchyliculture,
- d'étude de la biologie et de l'écologie des populations d'espèces exploitées,
- d'aquaculture dans les secteurs de la nutrition, de la reproduction et de la physiologie.

Ainsi, cet institut :

- anime et gère des grands projets scientifiques associant les secteurs de l'industrie et de la recherche,
- développe des programmes propres dans des domaines pour lesquels il détient une compétence spécifique,
- développe et met au service de la communauté nationale et internationale des moyens de travail à terre et en mer,
- développe au plan international des actions de coopération scientifique et technique,

- favorise la promotion de l'industrie française à l'exportation, en exerçant un rôle de consultant en support de l'industrie française.

Le Centre de Nantes, en accord avec les missions nationales, s'organise en cinq départements aux compétences précises et variées :

- Le Département "**Ressources halieutiques**" : il comporte deux laboratoires principaux :

\* le Laboratoire "Evaluation des Ressources Halieutiques", qui travaille à l'amélioration des méthodes d'évaluation et de gestion des stocks exploités ou exploitables,

\* le Laboratoire "Océanologie Halieutique", qui étudie les relations pouvant exister entre l'abondance des ressources et les facteurs de l'environnement (hydrologie, climat, pollution).

- Le Département "**Ressources aquacoles**" : il comprend le Laboratoire "Diversification et Algologie", dont la mission est de mettre au point les techniques de culture d'algues en vue de leur utilisation dans l'alimentation humaine ou dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique.

- Le Département "**Transformation et Valorisation des Produits**" : son objectif est de contribuer à la mise en valeur des ressources marines vivantes en menant des recherches sur la conservation, la transformation et l'extraction de produits commercialisables. Il travaille en relation étroite avec de nombreuses entreprises industrielles et regroupe trois laboratoires :

\* le Laboratoire "Génie Alimentaire", pour l'amélioration des techniques de conservation et de transformation, ainsi que pour la mise au point de nouveaux procédés agro-alimentaires appliqués aux produits de la mer,

\* le Laboratoire "Qualité et Physico-chimie", qui met au point, développe et standardise des méthodes analytiques telles que l'appréciation de la qualité biochimique des produits de la mer, la détection des protéines étrangères dans les produits à base de poissons ou la restructuration de la chair de poisson,

\* le Laboratoire "Biochimie et Molécules Marines", qui travaille sur la mise au point des méthodes permettant d'identifier et de quantifier certains marqueurs biochimiques, ainsi que sur des projets de recherche de substances d'intérêt industriel pouvant être extraites des produits marins.

Il faut ajouter à ces trois laboratoires une équipe spécialisée dans les "Etudes technico-réglementaires", qui apporte un appui technique aux administrations chargées d'élaborer et de faire appliquer les réglementations relatives à la qualité sanitaire des produits de la mer.

- Le Département "**Milieu et Ressources**" : il mène des recherches sur la qualité du milieu marin littoral et ses interactions avec les activités humaines. Il dispose à cette fin de deux laboratoires :

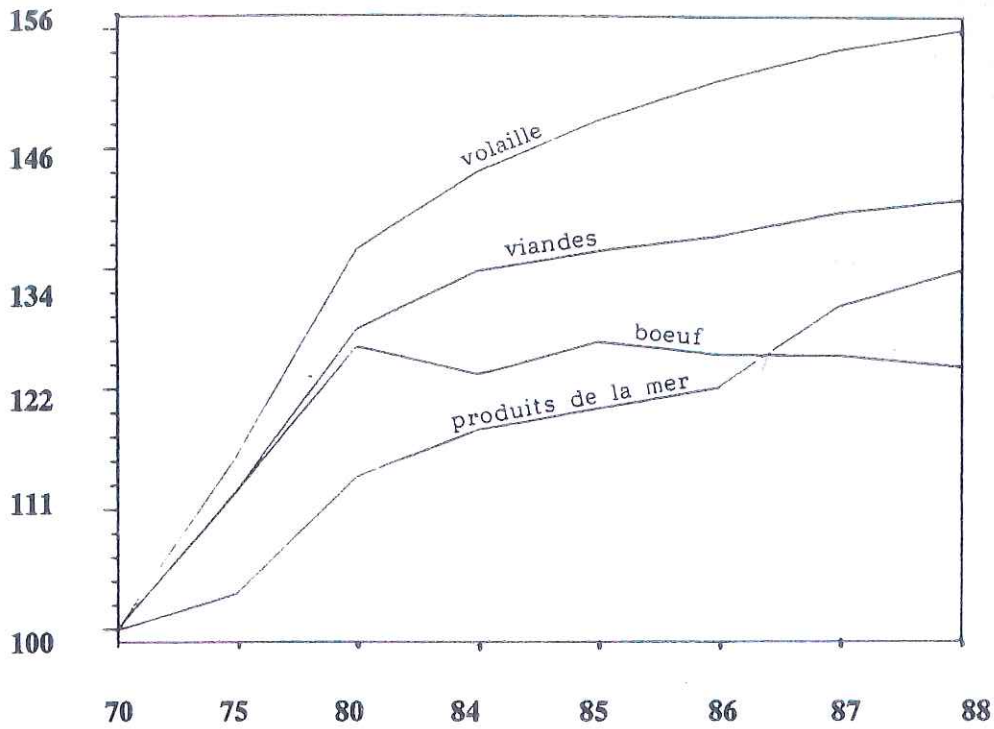
\* le Laboratoire "Chimie et Environnement", spécialisé dans la détermination de concentrations en polluants métalliques et organométalliques dans le milieu et les organismes vivants,

\* le Laboratoire "Effets Biologiques des Nuisances", qui étudie les mécanismes biochimiques de contamination des organismes vivants.

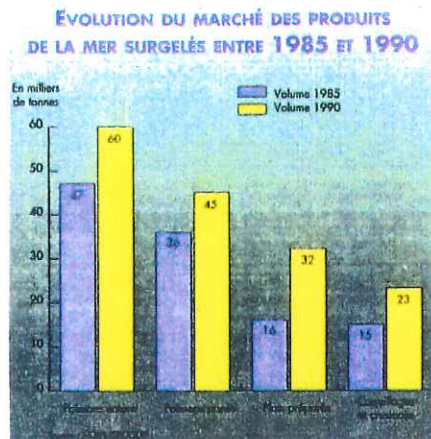
- Le Département "Technologie des Pêches" : il s'occupe de la gestion des stocks de diverses populations.

Ce stage s'est donc parfaitement bien intégré dans les objectifs de recherche du Centre de Nantes, au sein du Département "Transformation et Valorisation des Produits" et plus particulièrement au laboratoire "Qualité et Physico-chimie", dans l'optique d'appréciation de la qualité biochimique des produits de la mer.

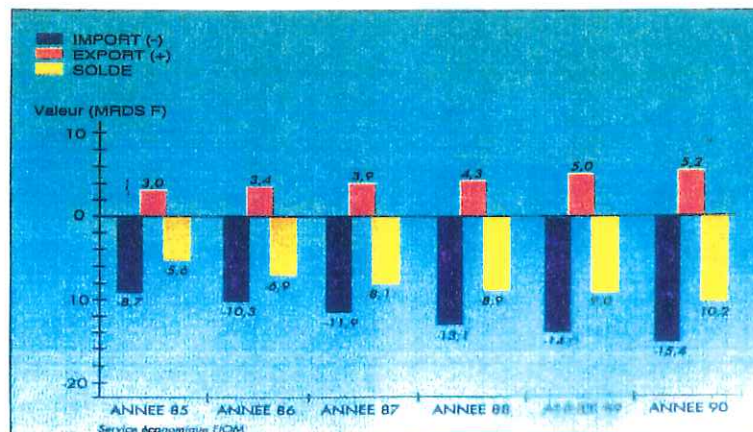
# INTRODUCTION



**Tableau n°1 :** Consommation des produits de la mer. Données 1990 - Indice en volume base 100 = 1970 (D'après Karpinski, 1990, CETEFIC, Source FIOM).



**Tableau n°2 :** Evolution du marché des produits de la mer surgelés entre 1985 et 1990. (D'après Renard, 1991, Source SECODIP).



**Tableau n°3 :** Evolution du commerce extérieur français des produits de la mer. (PDM n°6, Mars-Avril 1991 - Source FIOM)

## INTRODUCTION

Plus que toute autre, la filière produits de la mer a connu de profondes modifications ces dernières années. Contrairement aux viandes en général, ou au bœuf en particulier, les produits de la mer restent très appréciés des consommateurs (Tableau n°1).

En 1989, la consommation globale des produits de la pêche a augmenté de 4 % par rapport à 1988. Ainsi, le Fond d'Intervention et d'Organisation pour la pêche Maritime (FIOM) situe la consommation française des produits de la mer, pour 1990, à 18 Kg/habitant. Les français se placent donc parmi les plus gros consommateurs européens de poisson, derrière le Danemark, l'Espagne et le Portugal (Karpinski, 1990).

Selon l'OCDE (Anonyme, 1991), les produits transformés et les préparations à base de poisson ou de mollusque (conserves - congelés - semi-conserves...), semblent expliquer de façon générale cette progression. Parmi ceux-ci, les produits surgelés se distinguent beaucoup plus spécifiquement, avec une progression de 11 %. La SECODIP est plus affirmative encore, annonçant 40 % de hausse du marché des surgelés de 1985 à 1990 (Tableau n°2).

Corrélativement à l'évolution de cette demande, nous assistons à l'abaissement des ressources halieutiques dans le nord des eaux communautaires, qui se traduit par un plafonnement des quantités débarquées (Meuriot, 1986). Alors que la production française couvrait la moitié de la consommation nationale il y a 10 ans, elle ne satisfait plus, aujourd'hui, que le tiers des besoins (Renard, 1992). Seul remède face à ce déséquilibre : l'importation (Tableau n°3).

Outre les importations, la pêche est pratiquée loin de nos ports nationaux. Pour permettre un tel éloignement de nos côtes et une adaptation aux saisons de pêche toujours plus longues, les techniques et les équipements évoluent et se modernisent. Le poisson est, sinon transformé en mer, du moins tué, saigné, éviscéré et parfois congelé à bord.

De ce fait, le conserveur n'est plus en mesure de contrôler les traitements que subit le poisson. Or, certains poissons, de la famille des Scombridés (thon, maquereau), des Clupéidés (sardine, hareng), ou des Engraulidés (anchois), riches en histidine, sont sujets, s'ils ne sont pas traités dans de parfaites conditions de température et d'hygiène, à des décarboxylations bactériennes ou enzymatiques, *post mortem*, entraînant l'apparition d'histamine responsable d'intoxications alimentaires.

Prenant en considération ces cas d'intoxications histaminiques, le législateur a défini des normes et imposé des contrôles (circulaire du 4 Juillet 1984, du Service Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire).

Devant cette réalité, on conçoit aisément que l'industriel de la conserve ne puisse pas prendre de risque en achetant du poisson d'aspect apparemment satisfaisant. Or, il ne possède que très peu d'outils d'évaluation de la qualité du poisson. Certains tests organoleptiques lui permettent de juger de la qualité du poisson : Apparence - Couleur - Transparence des yeux - Odeur - Texture ... (Lamy-Dehove, Annexe 1). Mais, les réponses apportées ne restent que des approximations difficiles à standardiser et surtout très

subjectives. De plus, elles ne sont applicables qu'au poisson entier et ne préjugent pas de l'absence d'histamine ou d'autres amines biogènes.

Face à cet impact industriel et économique, il semblait fort intéressant de se pencher sur la mise en place d'une méthode de dosage de l'histamine dans les poissons, simple et accessible à tous. Ainsi, elle serait exécutable sur les lieux même de pêche, en amont des transactions. Elle assurerait aux conserveurs, une pleine confiance en la matière première brute, évitant ainsi l'apport de valeur ajoutée à un produit finalement invendable, car non conforme à la réglementation en vigueur.

Bien sûr, ce dosage est déjà pratiqué à l'aide de nombreuses techniques telles que : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), Chromatographie Couche Mince (CCM) et plus récemment, par réaction enzymatique. Toutes, sont reconnues fiables et efficaces, mais elles présentent pour certaines, le désavantage d'être lourdes à mettre en place, longues, onéreuses et ne permettent pas de traiter simultanément un grand nombre d'échantillons.

C'est pourquoi, notre objectif est de mettre l'accent sur la **célérité** et la **facilité** de ce dosage, ainsi que sur sa capacité à doser, sans équipement très spécifique, un nombre important d'échantillons.

A partir d'une méthode enzymatique de dosage de l'histamine, notre démarche s'articule sur la transposition à un appareil multifonctions présentant la particularité d'effectuer 96 lectures par seconde. Les nombreuses modifications analytiques engendrées sont résolues par la méthode des plans expérimentaux, puis, la comparaison à la méthode de dosage de l'histamine par Chromatographie Liquide Haute Performance, dite de référence, nous permet de valider ce dosage.



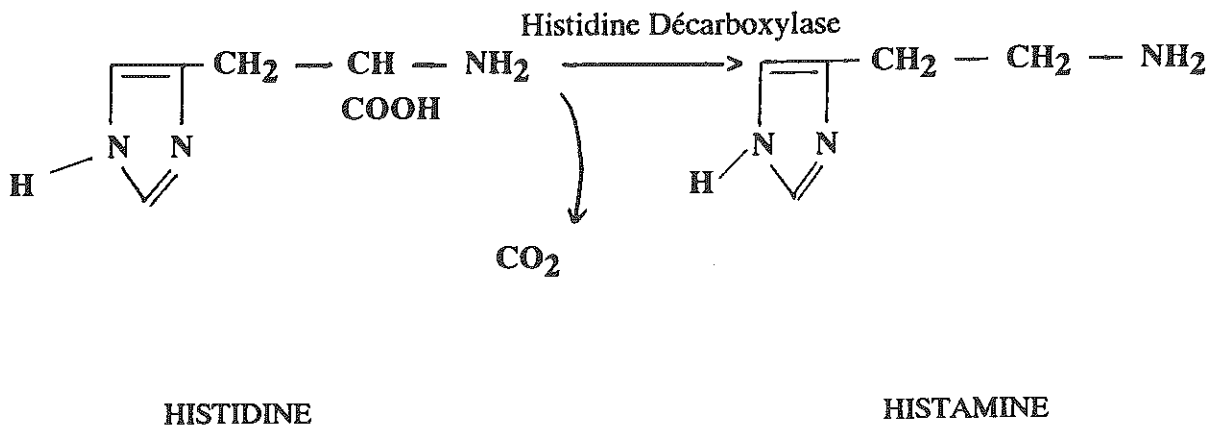
**PREMIERE PARTIE**  
**TRAVAUX ANTERIEURS**

## 2 – Mécanisme de formation des amines biogènes et en particulier de l'histamine

D'une manière générale, les amines biogènes résultent de la décarboxylation des acides aminés, au cours du métabolisme des plantes, des animaux et des micro-organismes.

Découverte et extraite, de l'ergot de seigle, par Akerman en 1910, l'histamine est surtout présente dans les produits résultant de la putréfaction bactérienne. Ce phénomène se traduit par une altération de l'aliment, qui ne peut être totalement stoppée ni par réfrigération, ni par congélation. Cependant, elle a pu être mise en évidence dans tous les tissus animaux (Nerrison, 1975).

Le principal processus métabolique de formation de l'histamine est la décarboxylation enzymatique post mortem, d'un acide aminé : l'histidine (Figure n°1). L'enzyme responsable est appelée histidine décarboxylase.



**Figure n° 1** : Formation de l'histamine

Quant aux autres amines biogènes : la putrescine, la cadavérine, la spermine, la spermidine et l'agmatine, Karmas and Mietz (1978), nous proposent (Figure n° 2), un processus de formation, à partir de protéines.

Dans un souci d'exhaustivité, la présentation des amines biogènes en général était nécessaire. Néanmoins, l'histamine demeure l'amine qui présente le plus d'intérêt tant d'un point de vue physiopathologique, que réglementaire et donc analytique. De ce fait, notre étude portera principalement sur l'histamine et de façon annexe, sur les amines biogènes.

### 3 – Origine de l'histamine

Les différents métabolismes de formation des amines biogènes et de l'histamine, nous inspirent la dichotomie suivante :

– l'*histamine physiologique* : produite sous l'action d'une histidine décarboxylase présente naturellement dans les tissus rénaux, hépatiques et intestinaux, elle y est rencontrée à des doses n'excédant pas 5 mg pour 100 g de tissus (Briand, 1989).

– l'*histamine bactériologique* : élaborée accidentellement dans les aliments à la suite de prolifération bactérienne post mortem, entraînant la synthèse d'histidine décarboxylase responsable de l'apparition d'histamine à des doses importantes et potentiellement toxiques.

Briand (1989) parle donc de *potentiel histaminogénique* d'un aliment. En effet, cette synthèse d'histamine est inhérente à plusieurs types de facteurs, que nous qualifierons d'*intrinsèques* ou d'*extrinsèques* :

#### 3 – 1 – Facteurs intrinsèques

Ils sont surtout liés à la composition biochimique du produit et reposent sur plusieurs caractéristiques.

##### 3 – 1 – 1 – Teneur en histidine libre dans l'aliment

L'histidine est un acide aminé essentiel présent surtout dans les pigments : hémoglobine, myoglobine, cytochrome (myohématine), cytochrome C et catalases (Billon, 1978). Selon Boyer (1956), l'hémoglobine du thon en contiendrait 8 %.

Dans le poisson, le taux d'histidine libre se trouve renforcé par le phénomène d'autolyse qui se produit après la mort. On assiste à une baisse du pH due à l'accumulation d'acide lactique produite au cours de la glycolyse anaérobie. Cette acidification active certaines protéases favorisant ainsi la production d'acides aminés libres (Golberg, 1986).

##### 3 – 1 – 2 – Activité des enzymes tissulaires

Les histidines décarboxylases biologiques, complètent l'action des enzymes bactériennes lors de l'autolyse, post mortem, de certains poissons comme le thon (Chauchaix et Paillet, 1980).

##### 3 – 1 – 3 – Espèce animale

Le développement potentiel de l'histamine dépend également des espèces et se trouve directement lié à leur teneur en histidine.

Les poissons à chair sombre tels que les Scombridés (thon, bonite, maquereaux), les Clupéidés (sardine, hareng) ou les Engraulidés (anchois), présentent la plus forte prédisposition à développer de l'histamine (Taylor and Lieber, 1977).

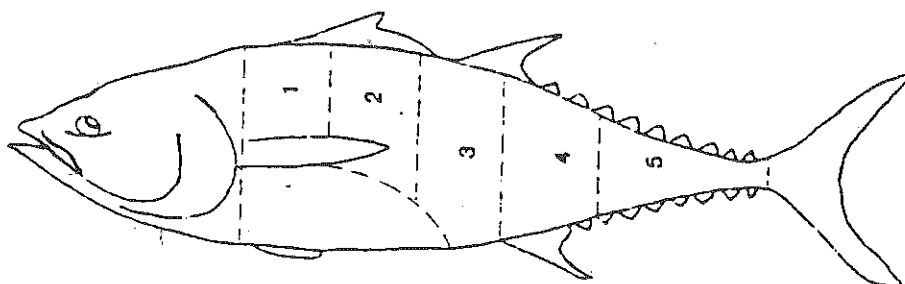
Espèces bactériennes	Activité Histidine décarboxylase	Production maximum d'histamine (mg. %)		
		Thon	Bonite	Porc
Protéus sp.23*	0	0	0	0
Hafnia 116*	0	0	0	0
Hafnia 314*	55	175	--	--
Hafnia 305*	105	290	200	86
Hafnia 308*	345	365	245	165
E. coli 10448	30	0	0	0
Hafnia 2027	190	240	--	--
E. coli hem.	660	380	420	110
Protéus morganii	930	585	240	160

\* Espèces isolées d'échantillons de thon toxique

L'activité de l'histidine décarboxylase est exprimée par la teneur en histamine ( $\mu\text{g}$ ) produite par 1 mg d'espèce bactérienne contaminante déshydratée, en 8 h à 37°C dans 1 ml de milieu de dosage.

**Tableau n°4** : Production d'histamine et activité de l'histidine décarboxylase de quelques souches bactériennes (traduit d'après Ferencik, 1970).

Température (°C)	Histamine (mg/100g de thon)				
	1	2	3	4	5
15.6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
21.1	2.8	1.0	0.9	1.0	0.8
23.9	74.5	6.5	3.2	2.5	4.9
26.7	102.0	6.9	1.6	4.5	2.9
29.4	114.0	72.5	56.0	52.2	71.5
32.2	248.0	--	41.3	--	45.2
35.0	369.0	241.0	84.4	59.1	59.6
37.8	643.0	540.0	472.0	479.0	534.0
40.6	354.0	236.0	--	185.0	255.0



Découpage du thon de 1 à 5

**Tableau n°5** : Histamine contenue dans différentes parties de Listao incubé 24 h à des températures variables (traduit d'après Franck and coll., 1981).

Quant aux poissons à chair blanche, les Gadidés (morue), les Soléidés (sole), ou les Merluccidés (merlu), ils sont peu sujets à en former.

### 3 - 2 - Facteurs extrinsèques

Ils englobent les paramètres extérieurs qui peuvent intervenir intimement ou de façon lointaine sur l'élaboration de l'histamine.

#### 3 - 2 - 1 - Présence de bactéries à histidine décarboxylase

Sun Pan and James (1985) ont montré que les bactéries incriminées, productrices d'histamine à des taux significatifs de toxicité étaient de type *Proteus*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Enterobacter* ou *Lactobacillus*.

Devant une liste aussi complète de bactéries mésophiles, thermophiles ou psychrophiles, nous pouvons aisément anticiper la mise en cause directe des bactéries dans la décarboxylation de l'histidine et donc, dans l'élévation incontrôlée de la teneur en histamine des aliments pollués ou souillés.

A titre d'illustration, citons Ferencik (1970) qui obtint de fortes teneurs en histamine (585 mg %) dans une chair de thon stérile uniquement contaminée par *Proteus morgani*, *Escherichia coli* ou *Hafnia alvei* (Tableau n°4). En revanche, aucune production d'histamine ne fut constatée lors des ensemencements par des bactéries à activité histidine décarboxylase négative.

Franck and coll. (1981) constatèrent que des thons dépourvus d'ouïes et de viscères présentaient des teneurs en histamine réduites de moitié. En effet, ces organes constituent de véritables lieux de prédilection du développement bactérien (Tableau n°5). Les observations de Lerke and coll. (1978), viennent parfaitement corroborer ces remarques. Ils ont remarqué que la concentration du muscle de poisson en histamine, s'élève en s'approchant de la cavité abdominale.

#### 3 - 2 - 2 - Conditions de pêche

Billon (1978), indique que des agressions non spécifiques telles que l'abattage du porc à la suite de l'électrochoc par exemple, entraîne une hypersécrétion surrénalienne avec décharge d'adrénaline, ce qui provoque une élévation du taux d'histamine plasmatique.

Ce phénomène observé expérimentalement sur le porc pourrait se produire lors de la capture du thon, dans des conditions particulières de pêche provoquant stress et fatigue de l'animal. Ceci expliquerait des cas d'intoxications histaminiques remarquées lors de la consommation de thon pêché par des plaisanciers et conservé à bord un à deux jours dans des conditions acceptables.

Ainsi, la capture du poisson ne doit présenter ni traumatisme, ni fatigue accrue de l'animal. De plus, une saignée complète, pratiquée rapidement après la mort, évite un enrichissement intempestif en hémoglobine et en myoglobine, précurseurs d'un développement histaminique.

ESSAIS	Histamine	Tyramine	Cadavérine	Putrescine
Frais	< 0.05	2.4 - 4.7	1.0	0.1
1 j. air	0.3	3.2	2.1	0.3
1 j. 80% CO <sub>2</sub>	1.6	3.2	2.1	0.5
2 j. air	338.0	44.9	38.8	4.1
2 j. 80% CO <sub>2</sub>	142.0	27.8	24.0	1.9
3 j. air	377.0	16.6	40.6	22.9
3 j. 80% CO <sub>2</sub>	372.0	21.6	52.9	26.8

**Tableau n°6** : Teneurs en amines biogènes du poisson frais (mg/100g), en fonction des conditions de stockage sous CO<sub>2</sub> (traduit d'après Watts and Brown, 1982).

### 3 - 2 - 3 - Conditions de stockage

Plusieurs paramètres peuvent intervenir sur la synthèse histaminique et dégrader les qualités des denrées alimentaires: la température, le pH, la salinité, la teneur en glucides, le potentiel rédox, la pollution ...

\* La température optimale de production de bactéries à activité histaminique est comprise, logiquement, entre 20 et 37°C : température de développement des germes mésophiles. Par contre, pour des températures inférieures à 10°C, il semblerait que l'accumulation d'histamine soit ralentie puis totalement stoppée à des températures inférieures à 0°C, ou supérieures à 60°C (Alison and Taylor, 1982).

\* Le pH optimal d'activité des décarboxylases bactériennes est compris entre 2,5 et 6,5 (Arnold and Brown, 1978). Ces valeurs correspondent, par ailleurs, au pH de la chair de poisson après capture, ce qui tendrait à expliquer en partie, la production d'histamine remarquée chez le poisson fraîchement pêché.

\* Bien que peu étudiée, il semblerait que la salinité optimale de croissance des bactéries à activité histaminique soit de l'ordre de 2 - 3 % pour *Proteus* (Kimata, 1961) et de 0,5 % pour *Klebsiella* (Taylor and Woychik, 1982). Quant à la production d'histamine proprement dite, Ababouch and coll. (1986) ont montré que la formation d'histamine est retardée chez la sardine fraîche lorsque la concentration en sel augmente de 0 à 8 %. Le phénomène semble reposer sur l'abaissement de l'activité de l'eau (AW). L'eau est rendue inaccessible aux micro-organismes, pour des valeurs proches de 0,8 - 0,6. Leur prolifération se trouve donc limitée.

$$AW = \frac{\text{H.R.}}{100} = \frac{\text{Pression de vapeur d'eau du produit}}{\text{Pression de vapeur de l'eau pure}}$$

HR = Humidité Relative

AW eau pure = 1

\* Certains auteurs (cités par Arnold and Brown, 1978) ont observé que la présence de glucides (glucose ou autres glucides fermentescibles) intensifiait l'activité des bactéries élaboratrices d'enzymes (histidine décarboxylase). Il semblerait que ces bactéries requièrent une certaine quantité de glucides comme source d'énergie utile à la synthèse et à la production de leurs enzymes. D'autres auteurs ont remarqué que l'activité de ces enzymes était plus importante pour des teneurs en glucose variant de 0,5 à 2 %, alors qu'une concentration supérieure à 3 % présentait un effet inhibiteur sur la formation d'enzymes, en dépit d'une croissance bactérienne.

\* Le potentiel d'oxydoréduction présente également une incidence sur l'accumulation d'histamine. Watts and Brown (1982) ont noté qu'un stockage du poisson en atmosphère enrichie à 80 % en CO<sub>2</sub>, inhibe l'accumulation d'histamine, seulement au cours des premières 48 heures. La présence du CO<sub>2</sub> n'a plus d'incidence lors d'un stockage prolongé (Tableau n°6).

## **1 – Symptomatologie**

Le concept de "pseudo-allergies" ou de "fausses allergies" alimentaires correspond à la manifestation de réactions cliniques, mimant les réactions allergiques (choc anaphylactique par exemple), sans qu'il n'existe de mécanismes immunologiques.

Selon Moneret-Vautrin (1990), les symptômes apparaissent après une courte période d'incubation (quelques minutes, voire quelques heures, plus rarement quelques jours) et se traduisent le plus fréquemment par :

- des manifestations cutanées dues à une vaso-dilatation facio-cervicale :  
rougeurs facio-cervicales,  
oedèmes,  
urticaire,  
inflammations locales ...
- des problèmes neurologiques :  
chute de la tension artérielle,  
céphalées,  
palpitations cardiaques – tachycardie,  
élévation du pouls.
- des anomalies digestives accompagnées de :  
douleurs abdominales,  
de nausées avec ou sans vomissement,  
de diarrhées,  
de coliques,  
de sensations de piqure au niveau de la bouche et de la trachée.
- des symptômes secondaires :  
larmolements,  
hypersalivation,  
suffocations,  
problèmes respiratoires...

Les troubles peuvent perdurer pendant 6 heures sans laisser subsister d'effet secondaire. Leur gravité varie selon la sensibilité des individus, l'amine et la dose ingérée (Taylor, 1983).

## **2 – Epidémiologie**

La première intoxication histaminique déclarée et mentionnée dans la bibliographie remonte à 1941. Cette dernière concernait vingt neuf personnes réparties en six familles ayant consommé du thon frais expédié au mois d'Août par chemin de fer vers Paris et présentant un aspect satisfaisant. La seconde fut mentionnée en 1945, elle incriminait également du thon frais (Legroux et coll., 1947).



Nous préciserons que l'aérobiose ou l'anaérobiose se traduit différemment selon les espèces bactériennes rencontrées. A titre indicatif, l'anaérobiose est plutôt favorable à l'espèce *Proteus morgani* (Arnold and Brown, 1978) et défavorable au genre *Hafnia* (Ferencik, 1970). On peut donc supposer qu'il y a eu compétition des germes en présence, lors de l'étude menée par Watts and Brown (1982).

## II - ASPECT TOXICOLOGIQUE

Les études épidémiologiques relatives à l'intoxication par des amines concernent exclusivement l'histamine et la tyramine dans une moindre mesure.

Avant tout, il convient de préciser que l'histamine est un vasodilatateur biologique sécrété par les thrombocytes des poumons, du foie et de la muqueuse intestinale. Elle est rencontrée sous forme d'histamine libre, d'acétyl et de méthyl histamine (Tableau n°7).

	Cerveau (mg/Kg)	Sang (mg/l)	Suc gastrique (mg/l)	Urine (mg/l)
Homme	0.1	50	13-355	10.4
Lapin	0.6	3000		
Rat	4.3	430		

**Tableau n°7** : Teneurs en histamine dans différents organismes  
(d'après Billon, 1978).

Nous qualifierons donc cette molécule biologique d'histamine *endogène* propre, contrairement à l'histamine *exogène* qui constitue un composant normal de nombreux aliments et qui n'engendre, normalement, pas de trouble. Toutefois, elle peut être source d'anomalies dans des cas précis d'ingestion à forte dose, ou encore face à des déficiences accidentelles ou génétiques, du catabolisme histaminique naturel.

Elle fut souvent incriminée dans l'étiologie des intoxications alimentaires consécutives à la consommation de poisson. C'est en 1946 que la notion "d'intoxication histaminique" a vu le jour (Billon, 1978). Dès lors, on employa le terme d'intoxication scombroidique, car associée le plus souvent à la consommation de poissons de la famille des scombridés, riches en histidine libre.

Au regard des nombreux cas d'intoxications rencontrés, l'étude toxicologique de cette amine prend tout son sens.

Dans ces deux cas, le transport effectué au mois d'Août, n'avait pas eu lieu en wagons réfrigérés.

En 1955, Boyer et coll. (1956) signalèrent une épidémie histaminique portant sur 500 personnes, parmi 4 000 consommateurs de quatre tonnes de thon expédiées de Méditerranée.

Tous ces poissons avaient été reçus aux Halles de Paris et ne présentaient pas, à l'inspection, de signe d'altération.

Depuis ces accidents, tous les lots de thons rouges en provenance de Méditerranée font l'objet d'une recherche systématique d'histamine (Billon, 1978). Les intoxications histaminiques furent ensuite signalées en France de façon plus sporadique : 1957 - 1976 - 1977.

En 1990, la Direction des Affaires Sanitaires et Sociales (DASS) et la Direction des Services Vétérinaires (DSV), reçurent neuf déclarations de foyers d'intoxications histaminiques collectives touchant cent quatre vingt six sujets. Ce chiffre, qui peut paraître élevé, ne représente en fait que 2,7 % des foyers déclarés, soit 2,3 % des malades répertoriés (Pignault et coll., 1991). Il est important de noter que l'évaluation exacte de la fréquence des intoxications individuelles est difficile, voire impossible, eu égard :

- à la brièveté des indispositions qui ne conduit pas à des consultations médicales systématiques,
- aux diagnostics qui ne peuvent être confirmés par le dosage des aliments,
- au système national de recueil et de saisie des données épidémiologiques.

Ainsi, on peut considérer que seuls les cas collectifs, frappant de nombreux patients sont enregistrés, répertoriés et analysés.

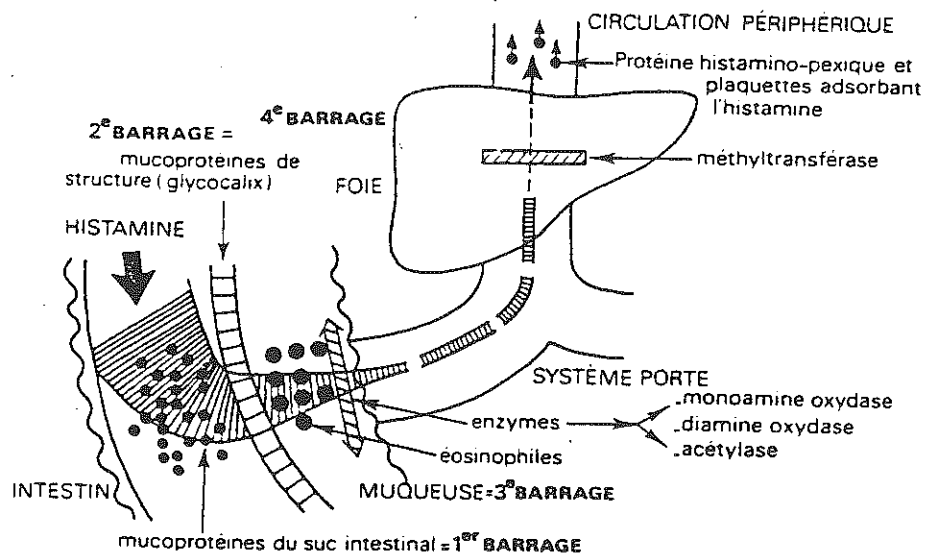
### **3 - Géographie des syndromes histaminiques**

Ces syndromes sont observés dans le monde entier (Japon, Etats-Unis, Royaume Uni, Europe, Canada, Afrique), particulièrement lorsque certaines espèces de poissons : thon, maquereau, bonite, mais également hareng, sardine, espadon, marlin, voilier..., font l'objet d'une consommation régulière.

### **4 - Pathologie**

Le syndrome histaminique peut résulter de l'ingestion ou de l'administration par voies autres que digestives, de substances de deux ordres :

- celles renfermant une quantité importante d'histamine,
- celles générant de l'histamine à partir de substrat rencontré chez le sujet. On les qualifiera de substances histamino libératrices telles que la tyramine par exemple (Billon, 1978).



**Figure n°3** : Les mécanismes de défense contre l'histamine intraluminaire (d'après Moncret-Vautrin, 1990).

Notons qu'une injection directe dans le sang est fortement toxique et peut parfois engendrer la mort, alors qu'une absorption digestive semble mieux supportée.

Moneret-Vautrin (1990) illustre par la figure n°3, l'existence de deux grands ensembles de lignes de défense :

- l'un au niveau intestinal.
- l'autre au niveau hépatique.

Au cours du tractus digestif, une partie de l'histamine peut se trouver fixée et inactivée par les mucoprotéines du suc intestinal (mucines), dans la lumière intestinale (1<sup>er</sup> barrage). Outre les mucines des sucs digestifs, celles constituant le glycocalix – couche recouvrant la muqueuse stomacale ou intestinale – fixent également l'histamine. Le passage dans l'épithélium se trouve ainsi ralenti (2<sup>ème</sup> barrage). Les molécules qui franchiront la muqueuse seront, soit soumises à la dégradation enzymatique des amines oxydases, soit phagocytées par les polynucléaires éosinophiles riches en histaminases (3<sup>ème</sup> barrage) (Weiss, 1932).

Or, la fixation de l'histamine par les mucines des sucs digestifs est d'autant plus élevée que le pH est plus acide. La présence simultanée de substances très basiques, telles que les diamines (putrescine ou spermine), interfère sur cette captation en l'inhibant. L'histamine peut ainsi traverser la muqueuse intestinale et exercer ses effets toxiques (Parrot et coll., 1970).

L'histamine intestinale, non métabolisée, sera transmise par la veine porte au niveau du foie. Selon Stopick and coll. (1974, cités par Moneret-Vautrin, 1990), une histaminase hépatique : la méthyltransférase, en cataboliserait la majorité ( $63 \pm 12\%$ ). Les molécules restantes seraient absorbées par des glycoprotéines sériques ou par les plaquettes. Ainsi, la teneur en histamine libre plasmatique, n'excéderait pas 2 mg/ml. Les métabolites élaborés seront éliminés par voie urinaire.

On peut noter également, que les molécules d'histamine non absorbées par la paroi gastrique ou intestinale, seront catabolisées par des enzymes bactériennes intestinales, puis éliminées par les fèces.

Malgré ces barrières naturelles de défense contre les ingestions d'histamine, nous devons considérer les anomalies pathologiques dues à des déficits tels que :

- cas d'hépatite virale qui perturbe la synthèse de méthyltransférase,
- anomalie de la flore intestinale qui déstabilise le catabolisme bactérien de l'histamine non fixée par les mucines digestives,
- patient migraineux déficitaire en monoamines oxydases plaquettaires,
- perméabilité anormale de la muqueuse intestinale,
- déficience enzymatique.

On rencontre également des dysfonctionnements dus à la consommation d'additifs ou de substances alimentaires, capables d'altérer de manière non spécifique, la barrière intestinale.

Exemples : nitrite de sodium -----> inhibition des monoamines oxydases  
café, thé, alcool, vinaigre, épices...: irritants alimentaires.

### 5 - Doses toxiques

Nous ne présenterons que les doses ingérables pour une personne de 70 Kg.  
Quatre niveaux de toxicité sont admis (Luten, 1983) :

- moins de 6 mg -----> aucun trouble,
- de 6 à 70 mg -----> légère forme d'intoxication,
- de 70 mg à 1 g -----> troubles relativement importants,
- au dessus de 1 g-----> accidents majeurs.

La Food and Drug Administration fixe la teneur en histamine précurseur de troubles à 20 mg/100 g (200 ppm) de poisson et le seuil de toxicité à 50 mg/ 100 g (Briand, 1989).

### 6 - Thérapeutique

Dans les cas d'intoxications légères, les symptômes disparaissent spontanément en quelques heures. Par contre, seuls les anti-histaminiques en injection intraveineuse, sont capables de stopper les symptômes, en cas d'intoxications graves.

### 7 - Prophylaxie des intoxications

A la lumière de l'étiologie des intoxications histaminiques, les mesures préventives proposées en faveur d'une limitation du développement de l'histamine dans les aliments peuvent être de plusieurs ordres :

- Application systématique de précautions au niveau de la pêche :  
Eviter le stress de l'animal,  
Eviscérer aussitôt après la capture et rincer à l'eau,  
Saigner parfaitement ...
- Respect impératif des mesures d'hygiène :  
Hygiène du personnel, propreté du matériel et des locaux,  
Maintien de la chaîne du froid...
- Rapidité des opérations de transformation...

Toutes ces mesures préventives devront bien sûr être renforcées durant la saison chaude.

Aliments	Quevauviller et coll. 1965	Taylor and coll. 1978	Pechaneck and coll. 1983	Moneret-Vautrin 1990
Emmenthal	24	non précisée	0.1 – 555	jusqu'à 1000
Choucroute	25	9 – 130	non précisée	160
Viande de porc	non précisée	non précisée	"	10
Vin	2 – 30	"	"	20
Pomme de terre	0.1 – 0.3	"	"	non précisée
Tomate	22	"	"	"
Epinard	38	"	"	"

**Tableau n°8** : Teneur en histamine (mg/Kg) des aliments frais (Bibliographie comparée).

Poissons	Quevauviller et coll. 1965	Moneret-Vautrin 1990
Thon frais	non précisée	5.4
Sardine fraîche	0.2	16
Saumon frais	non précisée	7
Filet d'anchois frais	non précisée	44
Crustacé frais	0.1	0.2
Thon conserve	4 – 20	20
Filet d'anchois conserve	25 – 33	33
Oeufs hareng fumé conserve	12 – 350	350

**Tableau n°9** : Teneur en histamine du poisson (mg/Kg) (d'après Quevauviller, 1965 et Moneret-Vautrin, 1990).

## 8 - Conclusion

Au regard de l'étude épidémiologique et des différents effets pathologiques engendrés par l'ingestion d'histamine, il semblait important de protéger le consommateur face à des produits dont il ne maîtrise pas la qualité. Ainsi, allons nous nous intéresser aux teneurs en histamine rencontrées dans les aliments et à la législation en vigueur.

## III - PRESENCE D'AMINES BIOGÈNES DANS LES ALIMENTS

### 1 - Teneurs dans les aliments

De nombreux aliments, toutes familles confondues, renferment naturellement de l'histamine ou des amines biogènes, à l'état frais.

A ce propos, la bibliographie internationale est très vaste, mais malheureusement peu homogène. C'est ainsi que, selon les auteurs et relativement aux mêmes produits alimentaires, les taux présentés sont très variables. Les tableaux n°8 et 9, nous présentent respectivement une bibliographie comparée des teneurs en histamine de quelques aliments frais et du poisson.

On remarque que les taux d'histamine varient selon les auteurs et les années. On peut penser que ces variations sont dues à l'évolution des techniques de dosage...

Les teneurs détaillées en amines biogènes de l'emmental et de la viande de porc frais sont traitées sur le tableau n°10.

<b>Aliments</b> <b>Amines</b>	<b>Emmental</b>	<b>Porc frais</b>
<b>Histamine</b>	0.1 - 555 (P) 24 (Q) jusqu'à 1000 (M)	5 - 23 (Lak) 10 (M)
<b>Putrescine</b>	0.05 - 73 (P)	17 - 1893 (Lak)
<b>Cadavérine</b>	0.05 - 74 (P)	13 - 479 (Lak)
<b>Tyramine</b>	51 - 696 (P) 220 (M)	5 - 41 (Lak) 10 (M)

P = Pechanek and coll. (1983)

M = Moneret-Vautrin (1990)

Q = Quevauviller et coll. (1965)

Lak = Lakritz and coll. (1975)

**Tableau n°10** : Teneurs comparées en amines biogènes (mg/Kg)  
des produits frais (Bibliographie comparée).

Amines \ Porc	Porc			Évolution à la putréfaction (%)
	Frais	Cuit	Putréfié	
Histamine	11 5-23	6 4-8	45 17-92	+ 309
Putrescine	702 17-1893	170 23-565	1494 73-3510	+ 114
Cadavérine	171 13-479	92 18-245	250 55-408	+ 46
Tyramine	11 5-41	3.5 3-4	22 13-35	+ 100

**Tableau n°11** : Evolution des taux d'amines biogènes (mg/Kg) rencontrées dans la viande de porc selon sa présentation (traduit d'après Lakritz and coll., 1975).

Espèces	Temps de stockage à 4°C (jours)			Temps de stockage à 20°C (jours)		
	0	7	14	0	1	2
Maquereau	0.32	0.65	0.60	0.73	17.77	237.97
Truite	0.08	0.19	0.90	0.17	2.13	1.67
Mulet	0.19	0.26	0.67	0.23	24.70	27.13
Crevette	0.22	0.52	0.96	0.40	0.63	0.37
Poisson chat	0.15	0.46	1.74	0.10	3.23	1.80

**Tableau n°12** : Valeurs moyennes des teneurs en histamine (mg/Kg) des espèces de poisson étudiées, en fonction des températures de stockage (traduit d'après Edmunds and Eitenmiller, 1975).

Temps (jours)	Filets de hareng		Filets de hareng stériles	
	Histidine	Histamine	Histidine	Histamine
0.5	125.5	-----	125.5	-----
2	141.8	-----	276.3	-----
5	121.3	1.9	293.2	-----
8	98.6	5.0	311.4	-----
11	83.4	8.7	118.3	-----
15	15.7	12.8	79.9	-----

**Tableau n°13** : Teneurs en histamine et en histidine (mg/100g) dans du hareng stocké à 2°C (traduit d'après Dabrowski and coll., 1968).



Le tableau n°11, établi par Lakritz (1975), nous permet d'apprécier l'évolution de la teneur en amines biogènes en fonction de la présentation de l'aliment : frais – cuit – altéré. On remarque aisément l'incidence négative de la cuisson sur le développement de l'histamine, probablement due à une réduction de la flore bactérienne d'altération. Par contre, la putréfaction s'accompagne d'une hausse notable du taux d'amines biogènes et surtout d'histamine.

## **2 – Influence des conditions de stockage sur la teneur en amines biogènes**

Edmunds and Eitenmiller (1975) ont étudié l'influence de la température de stockage sur l'évolution de la teneur en histamine chez plusieurs espèces de poissons (Tableau n°12). Quelque soit l'espèce observée, il en résulte que les basses températures limitent le développement rapide et exagéré d'histamine, prolongeant ainsi la durée de vie des poissons.

Dabrowski and coll. (1968) nous présente la réduction de la teneur en histidine, parallèlement à l'évolution de celle en histamine (Tableau n° 13). Nous remarquons très nettement la corrélation qui existe entre ces deux composés : l'histidine se présente bien comme le précurseur de la formation d'histamine. Néanmoins, il est intéressant de constater – en dépit de conditions de stockage relativement correctes – une augmentation de la teneur en histamine, dans des proportions ne conduisant toutefois pas à l'altération du produit. On observe également que la teneur en histamine n'est appréciable qu'après cinq jours de conservation à une température de 2°C.

Les auteurs font apparaître qu'un produit stérile, donc exempt de flore bactérienne, n'est pas sujet à l'élaboration d'histamine. Par contre, la teneur en histidine évolue jusqu'à atteindre un maximum au bout de huit jours. Elle décroît ensuite de façon spectaculaire, probablement par épuisement de substrat libérateur d'histidine.

## **3 – Réglementation**

Compte tenu des répercussions désagréables, parfois dangereuses, que peut engendrer la consommation de poissons altérés par de l'histamine, on assiste, depuis quelques années et dans de nombreux pays, à la publication d'indications précisant les doses maximales d'histamine tolérées dans les produits de la mer. Or, nous ne possédons pas de réelles normes officielles, mais plutôt des directives à caractère non réglementaire.

Actuellement, nous ne disposons que de très peu d'informations. Quelques pays ont toutefois instauré une réglementation :

– U.S.A. : \* Seuil de toxicité fixé à 50 mg/100 g.  
\* Teneur maximale compatible au respect des bonnes pratiques professionnelles déterminée pour 20 mg/100 g.  
\* Application aux thons Germon, Albacore, et Listao.

– Suède : \* Limite maximale rencontrée dans les poissons égale à 20 mg/100 g (Ordonnance entrée en vigueur le 1<sup>er</sup> Juillet 1980).

- Tchécoslovaquie : \* Teneur limite retenue de 40 mg/100 g.  
\* Cas particulier du thon et du maquereau : 20 mg/100g.

- Finlande : \* Seuil de 20 mg/100 g, retenue depuis plusieurs années comme limite supérieure d'acceptation.

D'autres pays en sont au stade des projets de réglementation :

- Suisse : \* Teneur limite de 10 mg/100 g.

- Finlande : \* Réduction de la teneur limite à 10 ou 20 mg/100 g.

- Danemark : \* Proposition de seuils fixés à 20 et 50 mg/100 g, accompagnés d'un plan d'échantillonnage à trois classes, portant sur un prélèvement de huit conditionnements unitaires par lot.

Quant aux autres pays, il ne s'agit que de directives :

- Canada : \* La directive publiée par le Ministère des "Pêches et Océans", stipule que les produits de la mer dont la teneur dépasse 10 mg/100 g sont de qualité défectueuse.

- Ex. R.F.A. : \* Un poisson présentant une teneur supérieure à 20 mg/100 g est jugé altéré. Le seuil de toxicité est estimé à 100 mg/100 g (Taylor, 1983).

- Pays Bas : \* Teneur de 10 mg/100 g utilisée comme critère d'acceptation des lots de produits marins.

- France : \* La circulaire du Service Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire du 4 Juillet 1984, fixe la dose limite acceptable, à 10 mg/100 g de thon frais. Elle stipule qu'un seul échantillon présentant une teneur en histamine supérieure, entraîne la saisie du lot dans sa totalité.

Cette valeur (10 mg/100g), tend à devenir la référence d'appréciation de la conformité sanitaire des produits transformés (conserves et semi-conserves).

- Au niveau Européen : \* la Commission des Communautés Européennes (CEE) procède actuellement à l'élaboration d'une directive relative aux échanges intra-communautaires des produits de la pêche. Il s'agit de la directive n°439/91 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche. Elle définit les conditions d'hygiène à respecter dans les entreprises de transformation des produits à base d'animaux marins, ainsi que les critères d'appréciation de la conformité sanitaire des produits : Microbiologie - Azote Basique Volatil Total (ABVT) - Triméthylamine (TMA) - Histamine - etc. En matière d'histamine, la conformité spécifique des scombridés et des clupéidés, mis sur le marché, s'apprécie sur un échantillon de neuf unités issues d'un même lot. Celui-ci est rejeté si la moyenne des neuf dosages est supérieure à 10 mg/100 g, si plus de deux résultats sont compris entre 10 et 20 mg/100 g, ou si un résultat est supérieur à 20 mg/100 g.

Type de dosage	Echantillonnage	Extraction	Purification-Séparation	Dosage
Allergologique	Plasma Plasma Plasma	néant néant N-butanol	néant néant néant	Enzymo-isotopique Immunologique Fluorimétrique
Expertise	Fluide biologique ou Aliment	Précipitation TCA et Extraction au solvant	Résine Echangeuse d'Ions	Colorimétrie → CCM ou Fluorimétrie → CCM → CLHP
Toxicologie Alimentaire	Fluide biologique ou Aliment	OUI (nature non précisée)	Chromatographie	Colorimétrie ou Fluorimétrie

**Tableau n°14** : Tableau synoptique des méthodes de dosage de l'histamine.

METHODE	ECHANTILLONNAGE	EXTRACTION	SUPPORT	SOLVANT de MIGRATION	REVELATION	SENSIBILITE	OBSERVATIONS
HARDY & SMITH 1976	Naquereau	TCA	Gel de silice G	Chloroforme 12 Méthanol 7 Ammoniaque 1	(non précisée)	(non précisée)	Dosage colorimétrique sur extrait TCA par passage sur résine amberlite CG 50 type I, et réaction de GEMMEDEMEIER-ANDREWS (p.bromaniline diazotée)
MERLISSE 1975	Conserves de thon var. Germon var. Albacore	TCA 10 %	Alumine type E	Ethanol 4 Ammoniaque 1	Réactif de Pauly	0,5 mg%	
SCHUTZ & coll. 1976	Thon à l'huile Thon en saumure	Aucune	Polyéthylène téréphtalate enduit de gel de silice	Acétone 95 Ammoniaque 5	Ninhydrine ou Réactif de Pauly	2,5 mg%	Avantages : - pas d'extraction préalable - solvant de migration spécifique de l'histamine
LIN & coll. 1977	Thon	Méthanol	Plaques de gel de silice G préalablement activée à la chaleur	Méthanol 20 Ammoniaque 1	Ninhydrine en solution à 3% dans le méthanol	0,1 µg	Dosage densitométrique (filtre à 570 nm)

**Tableau n°15** : Exemples de dosages de l'histamine par CCM (D'après Chauchaix et Paillet, 1980).

## **2 - Méthodes chimiques**

Ce domaine analytique est lui beaucoup plus vaste. En effet, nous remarquons que la totalité des protocoles de dosage chimique de l'histamine comprennent les étapes suivantes : Echantillonnage - Extraction - Purification - Séparation - Dosage quantitatif ou qualitatif.

De ce fait, la préparation de l'échantillon représente une étape primordiale de complexité variable et impliquée par la finalité du dosage. Ainsi, selon le domaine scientifique où on se place (allergologie, toxicologie alimentaire, toxicologie nutritionnelle, expertise, etc.), cette préparation comprend, ou non, une étape de purification ou de séparation, avant le dosage proprement dit.

Il nous est apparu plus explicite de représenter les différentes méthodologies de dosage de l'histamine, à l'aide du tableau synoptique n°14. Globalement, il laisse apparaître qu'il existe en fait, couplées les unes aux autres, des méthodes de coloration et de condensation d'une part (visualisation), et des techniques de séparation d'autre part. Certains protocoles ne présentent que très peu de séparation, par contre, d'autres nécessitent une double séparation-purification, en amont et en aval de la visualisation.

### **2 - 1 - Méthodes séparatives**

Les méthodes de séparation présentées ici sont exclusivement des méthodes chromatographiques et sont toujours couplées, avant ou après séparation-extraction de l'histamine, à une technique de visualisation.

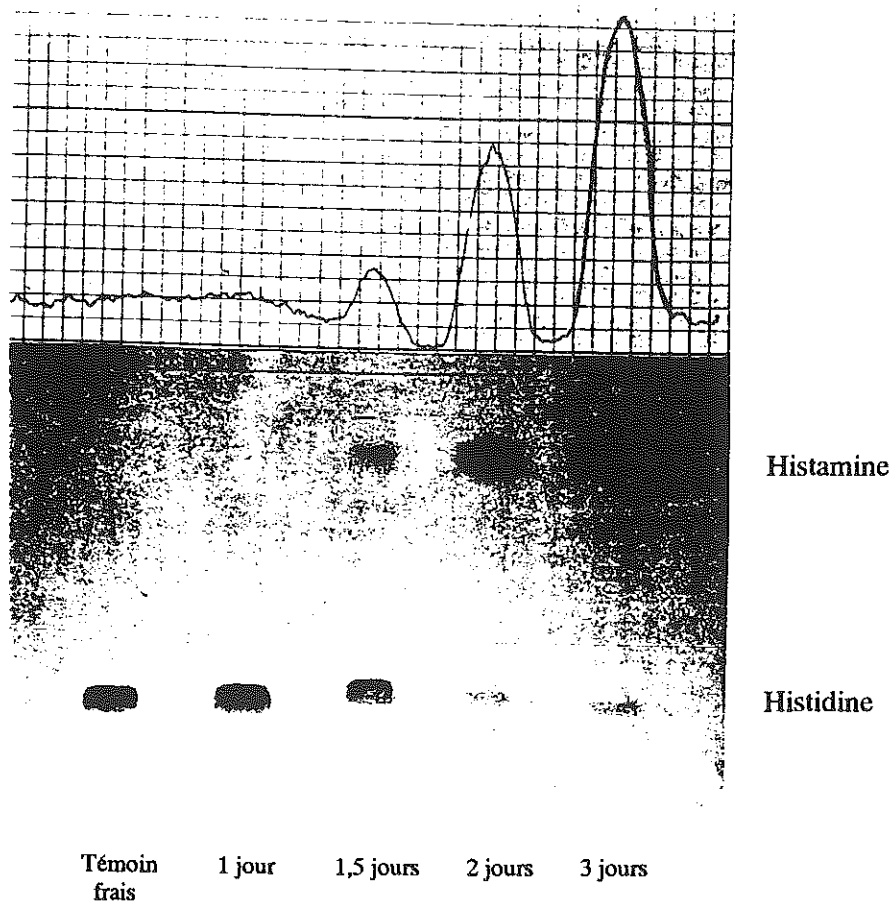
Nous avons fait le choix de ne pas être exhaustifs, mais de sélectionner les techniques qui présentent aujourd'hui, un intérêt analytique et qui sont utilisées.

#### **2 - 1 - 1 - Chromatographie couche mince : CCM**

Depuis 1976, de nombreux articles ont été publiés sur le dosage de l'histamine par CCM, couplée à des méthodes colorimétriques. Le tableau n°15 nous en présente quelques unes.

Globalement, le principe consiste à extraire l'histamine puis à déposer l'extrait obtenu sur un support solide appelé phase stationnaire. Au contact avec la phase mobile liquide (solvant de migration), l'histamine est soumise à une force d'entraînement. En fonction du degré d'adsorption des substances en présence, avec la phase stationnaire, nous obtenons une séparation des molécules. Après révélation de la plaque avec de la ninhydrine ou d'autres réactifs, l'histamine et les autres molécules apparaissent sous forme de "spot". La détermination de l'histamine est possible par comparaison des Rf (Retention Front) des échantillons, à celles des standards.

Il s'agit donc d'un dosage qualitatif. Une détermination semi-quantitative est possible par lecture densitométrique de la plaque de CCM.



**Figure n°4** : Plaque de Chromatographie sur couche mince – Conservation des échantillons à 30°C : la tache d'histidine disparaît alors que celle d'histamine se développe (d'après Nerisson, 1975).

La figure n° 4 nous présente une plaque CCM de dosage de l'histamine (Nerisson, 1975).

Le niveau de sensibilité obtenu avec cette méthode reste faible, à raison de 0,5 à 5 mg d'histamine/100 g d'échantillon poisson, ce qui la place plutôt comme une technique de détection d'une valeur seuil. Toutefois, une bonne technicité engendre une reproductibilité relativement correcte.

Enfin, on notera que ces méthodes ne requièrent pas d'équipements sophistiqués et coûteux, ce qui les classe parmi les techniques peu onéreuses de dosage de l'histamine.

### 2 - 1 - 2 - Chromatographie d'échange d'ions

Le principe de base, de cette méthode, réside dans la séparation de l'histamine sur une résine échangeuse de cations, suivie d'une révélation colorimétrique ou fluorimétrique. De ce fait, les résines échangeuses d'ions ont été largement utilisées pour purifier l'histamine.

C'est à Lerke and Bell (1976), que nous devons ce dosage rapide de l'histamine dans le thon. L'histamine est purifiée par passage sur résines, avant d'être complexée à l'orthophtalaldéhyde (OPT), puis lue au spectrofluorimètre.

On rencontre également un couplage avec la colorimétrie (méthode AOAC), afin de simplifier la préparation et la purification de l'échantillon (Luten, 1983; Ababouch et Afilal, 1989).

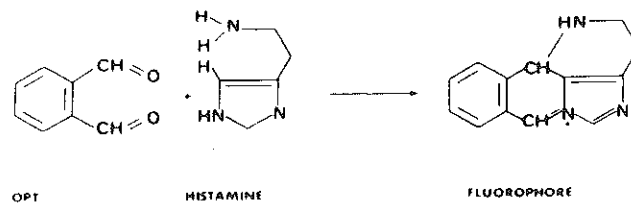
Ces méthodes sont précises et sensibles avec un seuil de détection de l'ordre du mg/100g échantillon poisson.

### 2 - 1 - 3 - Chromatographie Liquide Haute Performance: CLHP

La Chromatographie Liquide Haute Performance est également nommée CLHP ou HPLC, abréviation anglo-saxonne de High Pressure Liquid Chromatography. La terminologie française est retenue pour la présentation de cette étude.

L'introduction de la technique CLHP lors d'une analyse d'histamine présente des atouts considérables en terme de spécificité de dosage et de reproductibilité. En séparant l'histamine des autres amines ou de leur métabolite, on accroît notablement la sensibilité. Ainsi, elle est actuellement considérée comme la méthode de référence, utilisée pour le dosage fin et quantitatif de l'histamine. Or, elle est le plus souvent couplée à une technique colorimétrique ou fluorimétrique, en amont, en aval, ou les deux, de la séparation des molécules (Leclercq et Guilloux, 1989).

D'un point de vue chronologique, la technique CLHP la plus ancienne est celle de Mietz and Karmas (1977). Elle est utilisée pour le dosage de l'histamine et des amines biogènes dans le thon : l'étape CLHP est réalisée sur le dérivé fluorescent stable, obtenu par complexation au chlorure de dansyl. Il s'agit d'une dérivatisation pré-colonne.



**Figure n°5** : Formation d'un composé fluorophore – Dosage de l'histamine par la méthode fluorimétrique (d'après Chauchaix et Paillet, 1980).

## 2 - 2 - 2 - Fluorimétrie

Les dérivés fluorescents rencontrés sont essentiellement au nombre de deux (Leclercq et Guilloux, 1989), formés à partir :

- d'halogénures acides tels que le chlorure de benzoyl ou le chlorure de dansyl. Cette technique reste toutefois non spécifique des amines primaires et nécessite une séparation des dérivés par CCM ou par CLHP, ce qui alourdit considérablement la manipulation.

- de réactifs fluorogènes spécifiques tels que l'orthophtalaldéhyde (OPT) ou la fluoescamine.

C'est à Shore and coll. (1959, cités par Chauchaix et Paillet, 1980) que l'on doit la mise au point de cette méthode, sensible et spécifique. Basée sur la condensation de l'histamine avec l'OPT, elle donne en milieu alcalin, un composé fluorescent qui, par acidification, conduit à la formation d'un fluorophore encore plus fluorescent et surtout plus stable (figure n°5). Suivie d'une mesure au spectrofluorimètre, elle permet d'apprécier la teneur en histamine. Néanmoins, il faut considérer que :

- l'histidine donne également un fluorophore stable en milieu acide, d'où l'intérêt d'une séparation préalable.

- la stabilité du fluorophore s'avère toutefois limitée dans le temps, en dépit de l'acidification.

Nous noterons également les travaux de Luten (1981), qui a mis au point une méthode fluorimétrique automatique, de dosage de l'histamine dans les produits à base de poisson. Préalablement au dosage fluorimétrique, l'histamine est extraite (liq/liq), puis complexée à l'OPT. L'automatisation est réalisée par une chaîne Technicon, qui permet un dosage en routine de vingt échantillons à l'heure. Cette méthode est pratiquée dans certains pays tels que la Grande Bretagne ou les Pays Bas.

Au regard de ses différentes présentations, il est indéniable que l'OPT est actuellement une molécule très utilisée pour complexer l'histamine, en échange d'ions (méthode AOAC), en automatisation (méthode Technicon) ou pour les différents dosages par CLHP. Aujourd'hui, la méthode de complexation à l'OPT, en dérivatisation pré-colonne est très utilisée en France, pour doser l'histamine seule. Les amines biogènes peuvent, quant à elles, être dosées en dérivatisation pré-colonne, par extraction préalable du complexe amine-OPT, à l'acétate d'éthyle (Gouyguou and coll., 1987), ou bien post-colonne, après séparation des amines en phase inversée, suivi d'une complexation à l'OPT (Ritchie and coll., 1989).

Enfin, à la convergence de ces deux grands groupes de dosages (biologiques et chimiques), apparaissent les méthodes biochimiques. Nous envisagerons donc la présentation de la méthode enzymatique et de la méthode immunologique, toutes deux considérées comme des analyses rapides et semi-quantitatives.



### **3 - Méthodes biochimiques rapides**

#### **3 - 1 - Méthode enzymatique**

Il s'agit de la méthode décrite par Lerke and coll. (1978) dont nous nous sommes largement inspirés.

Elle a fait l'objet d'études visant à alléger la manipulation ou à en amoindrir le coût, par immobilisation des enzymes sur une membrane régénérable telle une électrode (Romette, 1982; Gérard, 1985) ou sur une bandelette test. Ces deux études ont été testées à l'IFREMER de Nantes et très vite délaissées, car elles demandaient une technicité trop importante, entraînant des variations incontrôlables dues au changement de manipulateur.

#### **3 - 2 - Méthodes immunologiques**

Ce sont les dernières méthodes apparues. Elles reposent sur la découverte d'anticorps monoclonaux spécifiques : anti-histamine. La difficulté majeure rencontrée lors de la mise au point de cette technique, réside essentiellement dans le fait que l'histamine est un haptène de faible poids moléculaire, possédant plusieurs analogues structuraux très proches (histidine, méthyl-histamine), facteurs d'interférences. Il sera donc nécessaire de coupler l'histamine à une autre molécule (protéine par exemple), pour obtenir un complexe détectable. Nous faisons allusion ici, à la méthode récente de Guesdon et Chevrier (1988).

Ces techniques très prometteuses font l'objet d'études en cours de réalisation, où l'accent est mis sur la production d'anticorps monoclonaux encore plus spécifiques...

### **4 - Autres méthodes**

N'oublions pas la méthode enzymo-isotopique de Snyder and coll. (1966, cité par Leclercq et Guilloux, 1989). Il s'agit d'un dosage radio-enzymatique utilisant l'histamine N-méthyltransférase comme traceur radioactif.

Toutefois, cette technique n'a pas fait l'objet d'applications alimentaires. Selon Chauchaix et Pailler (1980), il semblerait que ce soit dû à l'extrême délicatesse de sa réalisation, nécessitant la manipulation d'isotopes radioactifs.

### **5 - Conclusion**

La synthèse bibliographique des méthodes de dosage et d'identification de l'histamine dans les aliments fait ressortir qu'il s'agit d'un domaine assez vaste et complet. Toutes ces techniques ne présentent pas une utilisation actuelle. Il semble donc intéressant d'en effectuer une classification ne retenant que les dosages rencontrés aujourd'hui dans les laboratoires de contrôle ou de recherche :

- Techniques fines et quantitatives, qui sont le plus souvent lourdes, et onéreuses, mais sensibles et spécifiques. Nous citerons les méthodes de référence telles que:

- \* la Chromatographie Ionique de séparation et de purification de l'histamine,
- \* la CLHP avec ses deux variantes,
- \* la Méthode Fluorimétrique automatique, en flux continu (Technicon).

- Techniques rapides et semi-quantitatives, dont la précision est suffisante pour des contrôles courants, visant à déterminer un seuil d'acceptabilité. Nous entendons ici les dosages enzymatique et immunologique.

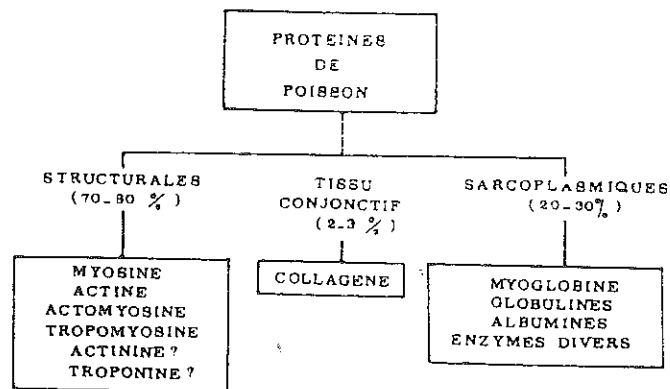
En fonction de ses priorités, l'analyste peut donc déterminer la technique qui répond le plus à ses besoins, sachant qu'une veille technologique est judicieuse face à un domaine de recherche très fertile et prometteur...

**DEUXIEME PARTIE**

**DOSAGE ENZYMATIQUE RAPIDE  
DE L'HISTAMINE**

POISSONS MAIGRES		Poissons plats		POISSONS GRAS	
Cabillaud	0,1 - 0,9	Carrelet	1,1 - 3,6	Sardine	1 - 23
Eglefin	0,1 - 0,6	Limande	0,5 - 1,2	Hareng	0,8 - 25
Lieu noir	0,3 - 0,6	Turbot	2,1 - 3,9	Maquereau	6 - 23
Lieu jaune	0,6 - 0,8	Sole	1,8 - 2,3	Saumon	0,4 - 14
Merlan	0,2 - 0,6			Anguille	0,8 - 31
Merlu	0,4 - 1,9			Anchois	0,9 - 6
Raie	0,1 - 1,6				
Roussette	3,9 - 5,6				
Dorade	1,0 - 3,3				
Bar	0,8 - 2,5				
Rouget	4,4 - 5,3				
Lingue	0,1 - 0,4				
Mulet	3,9				

**Tableau n°16** : Variation de la teneur en matière grasse (en % des muscles) (d'après Piclet, 1980).



**Figure n°6** : Les protéines constitutives du muscle de poisson (d'après Le Roux, 1982).

## DEUXIEME PARTIE – DOSAGE ENZYMATIQUE RAPIDE DE L'HISTAMINE

### I – MATERIEL

#### 1 – Matériel biologique

##### 1 – 1 – Composition biochimique du poisson

Il est habituel de différencier et de classer les poissons selon leur teneur en matières grasses. Sachant que celle-ci peut fluctuer avec les saisons, on rencontre classiquement trois groupes de poissons, comme les présente le tableau n°16 (Piclet, 1980):

– Les poissons maigres : La faible teneur en lipides présents dans la partie consommable de l'animal (< 5%), est liée au fait que ces espèces fixent leurs graisses de réserve, dans le foie et non dans les muscles. Les espèces les plus communément évoquées sont la morue, le lieu, le merlu, le merlan, etc.

– Les poissons gras : Contrairement aux poissons maigres, ces derniers stockent leurs graisses dans les muscles, puis en dépôts sous la peau et dans la cavité abdominale. Leur teneur en lipides est supérieure à 5% (Le Roux, 1982). Les espèces les plus couramment citées sont le hareng, la sardine, le maquereau, etc.

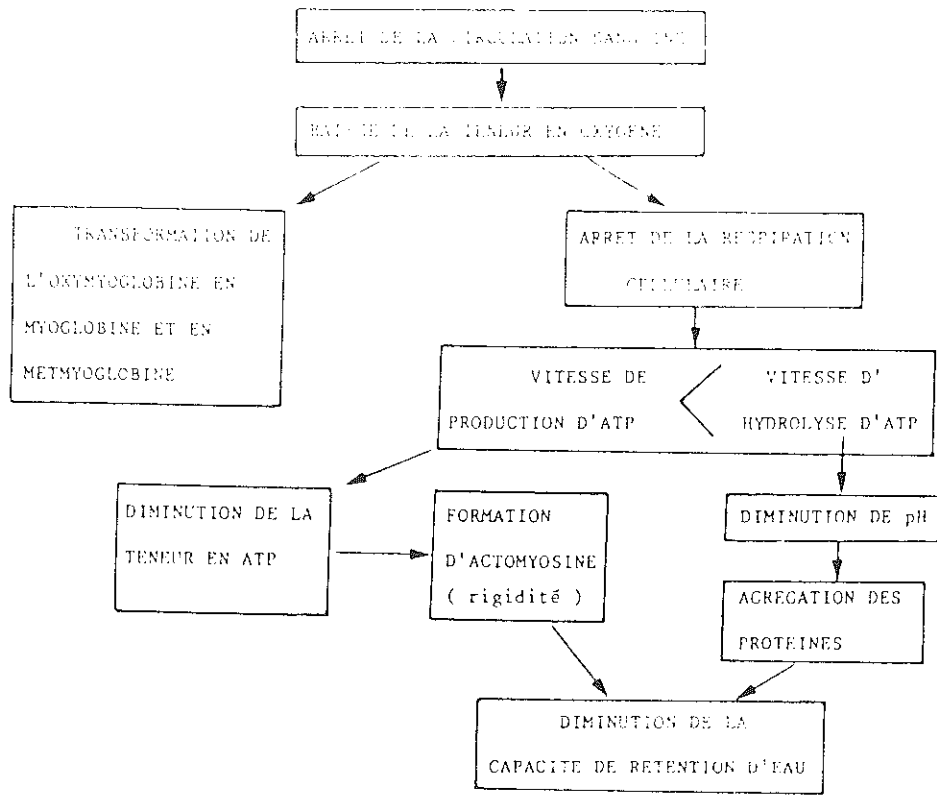
– Les poissons plats : Ils peuvent représenter un cas de figure intermédiaire, en accumulant tout d'abord les graisses dans le foie, puis dans les muscles, lorsque la nourriture devient abondante. Nous citerons le carrelet, la limande, la sole, le turbot, etc.

Globalement, la composition biochimique des poissons s'articule ainsi, (teneurs exprimées en % de matière brute) :

– Protéines	18 – 25 %
– Lipides	1 – 25 %
– Eau	60 – 80 % (variable selon la teneur en lipides)
– Cendres	environ 1 %

Le muscle de poisson comporte trois catégories de protéines (figure n°6) :

- Les protéines myofibrillaires (70%) : Protéines structurales insolubles.
  - . la myosine : 40% des protéines totales,
  - . l'actine : 15–20% des protéines totales.
- Les protéines sarcoplasmiques (20–30%) : Protéines solubles.
- Les protéines du tissu conjonctif, présentes en faible quantité (3–10%).



**Figure n°7 :** Principales modifications intervenant dans les tissus musculaires après la mort de l'animal (d'après Cheftel, 1989).

Par ailleurs, on distingue deux types de poissons au regard de leur muscle dont l'aspect (couleur), la composition, la structure et la fonction diffèrent : les poissons à muscle "blanc" et les poissons à muscle "sombre".

La pigmentation "rouge" des muscles sombres est principalement due à la présence d'une hétéroprotéine : la myoglobine.

### 1 - 2 - Evolution post mortem du système musculaire

Après la mort de l'animal, on assiste à des transformations biochimiques qui correspondent principalement à des réactions d'hydrolyse du tissu musculaire. L'ATP (Adénosine Tri phosphate) se dégrade et il se produit une désorganisation de la structure cellulaire. Ces modifications se traduisent par une perte des propriétés élastiques du tissu musculaire, entraînant une contraction et un raccourcissement du muscle. Le muscle se trouve alors en "rigidité cadavérique" ou en "rigor mortis".

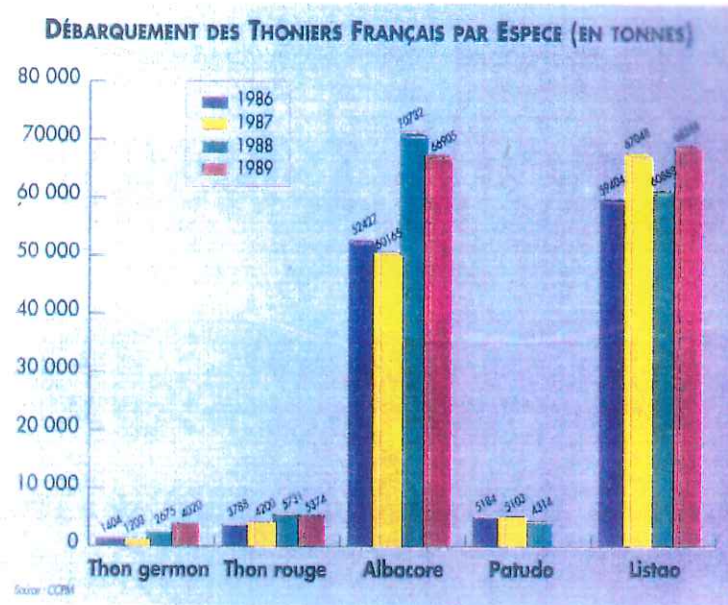
Ce phénomène intervient après la mort, chez les animaux à sang chaud et chez les poissons, respectivement après 30 h de conservation à 0°C, et 5 h de conservation à 0°C. Il s'accompagne d'une baisse du pH de 7,0 vers 6,2-6,5; qui remonte ensuite vers 6,6-6,7. Ces modifications contribuent à l'instabilité du poisson après la mort (Cheftel, 1989). L'ensemble du processus est représenté à l'aide de la figure n°7.

### 1 - 3 - Matériel biologique

L'optimisation du dosage est menée spécifiquement sur le thon, et plus précisément sur le thon "Germon", appelé également "thon blanc" ou *Thunnus alalunga* (figure n°8).



**Figure n°8** : Le thon Germon (*Thunnus alalunga*)  
(PDM n°9, Sept. Oct. 1991 - Source FIOM)



**Figure n°9** : Débarquement des thoniers français par espèces (en tonnes)  
(Source CCPM – PDM n°8 Juil/Aout 1991).



**Figure n°10** : Spectrophotomètre type lecteur de plaques.



Ce poisson appartient à la classe des Téléostéens ou poissons osseux, de l'ordre des Perciformes ou perches de mer, et à la famille des Scombridés (Anonyme, 1991).

Le Germon pèse de 4 à 10 Kg et se caractérise par une nageoire pectorale très longue et une chair de couleur beige rosée. D'un point de vue étymologique, c'est à cette nageoire que lui revient le nom de "Germon". Il s'agirait en effet, d'une déformation du vocable anglais "warman", qui signifie "homme de guerre". L'allure falciforme de cette nageoire pectorale rappellerait celle d'un sabre ! (Piquion, 1985).

Poisson migrateur vivant en bancs entre deux eaux, on le trouve notamment dans les eaux tièdes de 10 à 25°C de l'Atlantique, de juin à octobre. Notre choix s'est donc limité principalement à cette espèce, pour des raisons de proximité des lieux de pêche.

De plus, sa chair très appréciée des consommateurs en fait le thon le plus consommé à l'état frais, et les conserves de thon Germon sont classées parmi les produits de haute qualité gustative (Renard, 1992).

D'un point de vue économique, nous aurions effectivement pu choisir le thon Albacore, qui représentent des tonnages français débarqués très nettement supérieurs (figure n°9). Mais, la pêche en eaux tropicales, de cette espèce, n'offre pas une bonne connaissance des paramètres de conservation du poisson. Toutefois, nous avons eu recours à des conserves de thon Albacore, pour réaliser l'étude comparative par CLHP.

Pour des raisons de commodité, le Germon que nous utilisons se présente conditionné en boîtes de conserves appertisées. Préalablement, le poisson a été paré, éviscéré, découpé et broyé sous vide. Le broyat obtenu a été réparti dans des boîtes 1/12<sup>e</sup> de 50 g, serties puis stérilisées durant 20 minutes à 120°C. Ainsi préparé, le thon s'est conservé durant toute la période de notre étude.

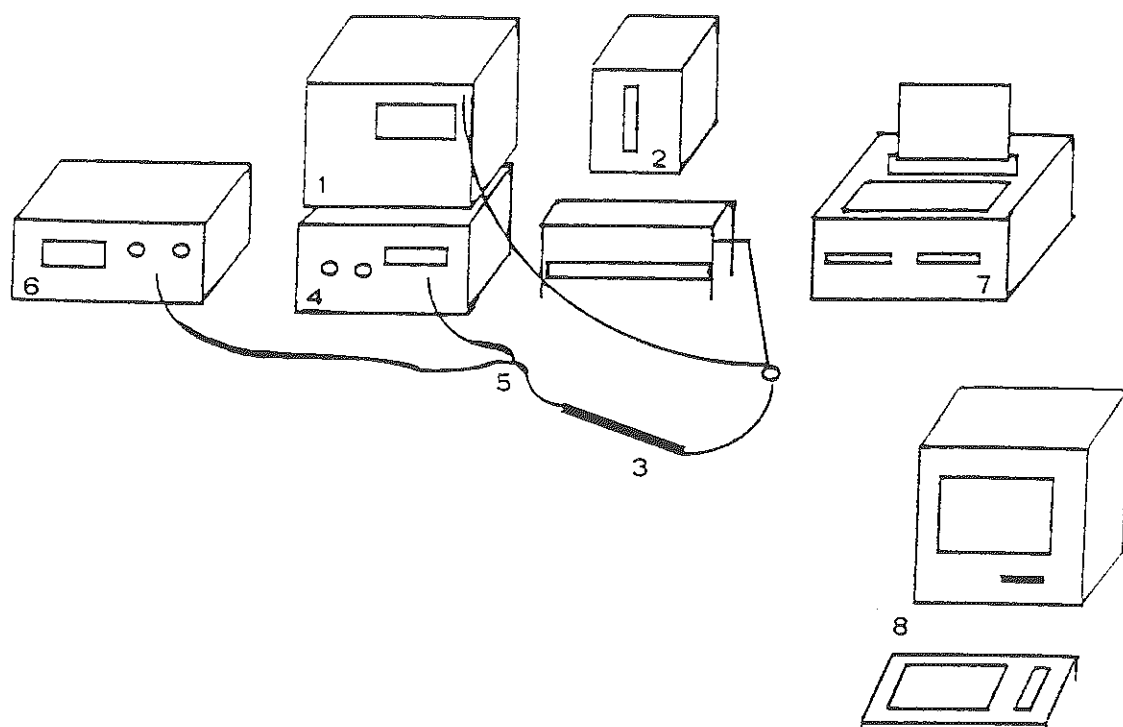
## **2 - Matériel scientifique**

Le matériel utilisé lors de cette étude, se résume, d'une part à un équipement courant de laboratoire :

- Balance analytique Sartorius (précision 1/10<sup>e</sup> de mg, portée 300 g), balance de précision Sartorius (précision 1 cg, portée 3 000 g), pH mètre, pipettes automatiques, bain-marie ...
- Broyeur à bol de type "Turmix", de marque Sofraca,

et d'autre part, à du matériel plus sophistiqué et spécifique, rencontré plutôt au sein des laboratoires de recherche :

- Centrifugeuse réfrigérée Kontron "H 401",
- Spectrophotomètre type Lecteur de plaques, "Anthos Labtec Instruments HT 2/LP", équipé de filtres, thermostaté et permettant une agitation des plaques avant la lecture (illustration figure n°10),
- Spectrophotomètre à lampe, Shimadzu, "U.V. 160",



**Figure n°11** : Equipement CLHP.  
(D'après Darzacq, 1992)

Réactifs	Référence	Pureté	Poids moléculaire (g)	Solvant	Stockage
Diamine oxydase de porc (PDAO)	Sigma 7876	0,06 U/mg	---	eau distillée	4 - 5 °C
Horserradish peroxydase (HRP)	Sigma P 8250	5 U	---	eau distillée	4 - 5 °C
Leuco Crystal Violet (LCV)	Aldrich 21,921-5	95 %	373,5	HCl 0,5 %	4 - 5 °C obscurité
Dichlorhydrate d'histamine	Sigma H 7250	—	184,1	aqueux	4 - 5 °C
Dihydrogéné phosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck 4873	99,5%	136,09	eau distillée	4 - 5 °C
Hydrogéné phosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck 6580	2 H <sub>2</sub> O	177,99	eau distillée	4 - 5 °C

**Tableau n°17** : Caractéristiques des réactifs du dosage.

- Pipettes de précision multicanaux (annexe 3),  
- Chromatographie Liquide Haute Performance Merck (figure n°11), avec dérivatisation post-colonne comprenant :

- \* une pompe basse pression à gradient ternaire, Merck "L 6200" (1),
- \* un autopréparateur-injecteur Gilson "Dilutor 401", équipé d'une électrovanne Rhéodyne à boucle d'injection de 20 $\mu$ l (2),
- \* une colonne "Hypersil ODS" 5 $\mu$  (150 X 4,6 mm), en C 18 phase inversée, Colochrom (ref. 50.02.21),(3),
- \* une pompe isochratique Merck "655A-11", qui assure la dérivatisation post-colonne (4),
- \* une tubulure en "T" qui permet le mélange de l'éluant en sortie de colonne avec la solution complexante (OPT), (5),
- \* un spectrofluorimètre Merck "F 1000", munie d'une lampe au xénon et de deux monochromateurs, ainsi que d'une cuve de lecture de 12  $\mu$ l, alimentée en continue, (6),
- \* un enregistreur-intégrateur Merck "D 2500", qui réalise les chromatogrammes, l'intégration des pics visualisés et le calcul de concentration en amines, à partir d'une gamme étalon, (7),
- \* un logiciel d'exploitation des résultats CLHP "Manager", version 2, (8).

De plus, nous disposons de deux outils informatiques, installés sur un ordinateur Olivetti "386 SX" compatible PC :

- le logiciel Statgraphics, version 5.0, vendu par Uniware Paris, qui permet le traitement des données par la méthodologie des plans d'expériences, puis le tracé des courbes de résultats, des surfaces de réponse et le calcul des coefficients de régression et des seuils d'acceptabilité (test de Fisher),

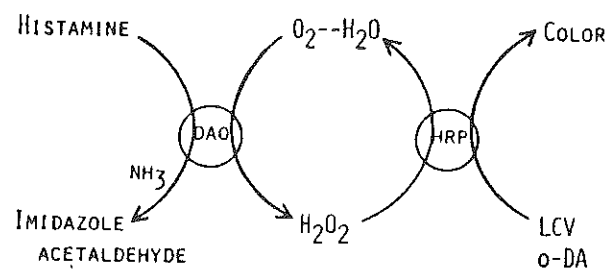
- le logiciel de pilotage du lecteur de plaques "Cinétique", de Y Cadiou et F. Galgani, IFREMER Nantes.

### 3 - Réactifs

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- solution aqueuse de diamine oxydase de porc : PDAO,
- solution aqueuse de peroxydase de raifort : HRP (Horseradish peroxydase),
- solution de leuco crystal violet dissous dans de l'acide chlorhydrique à 0,5% : LCV,
- solutions tampon phosphate 0,15 ou 0,30 M; pH=6,8 : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (mélange des deux solutions en proportions telles que le pH atteigne la valeur de 6,8),
- solution de dichlorhydrate d'histamine.

Leurs caractéristiques figurent sur le tableau n°17.



**Figure n°12 :** Principe du dosage enzymatique de l'histamine (Lerke and coll., 1983)

DAO = Diamine Oxydase    HRP = Horseradish Peroxydase

LCV = Leuco Crystal Violet

## II - OPTIMISATION DU DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'HISTAMINE

Ce dosage est largement inspiré de la publication de Lerke and coll. (1983), puis optimisé par rapport au spectrophotomètre utilisé : le lecteur de plaques.

### 1 - Principe du dosage

Le principe du dosage repose sur l'utilisation d'un système enzymatique à double pas, dont le substrat initial est l'histamine.

Dans un premier temps, une diamine oxydase catalyse l'oxydation de l'histamine en aldéhyde (imidazole acétaldéhyde), avec libération d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), qui est considéré comme substrat intermédiaire.

La deuxième enzyme, une peroxydase, entre en action, en catabolysant le peroxyde d'hydrogène formé. On assiste alors à la régénération de l'eau et de l'oxygène, utilisable par la première enzyme.

Les réactions sont visualisées par l'oxydation simultanée d'un composant incolore, le leuco crystal violet, en un composé de couleur violette, le crystal violet.

La figure n° 12 illustre l'ensemble des réactions.

L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité d'histamine présente.

Nous le qualifierons de dosage "*enzymo-colorimétrique*".

Il s'agit d'un dosage semi-quantitatif pouvant être utilisé en routine.

### 2 - Cinétique de la réaction enzymatique

Dans une réaction enzymatique, l'activité est exprimée par la vitesse de la réaction de catalyse (V ou Vitesse moyenne:  $V_m$ ).

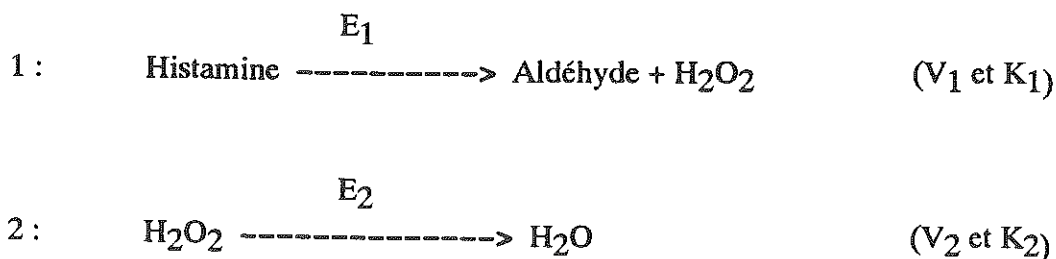
Cette vitesse dépend de trois facteurs principaux :

- la concentration en enzyme : E,
- la concentration en substrat : S,
- l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

L'affinité de l'enzyme pour le substrat peut s'apprécier par la détermination de la constante de Michaëlis ( $K_m$ ), qui est d'autant plus faible que l'enzyme a d'affinité pour le substrat. Ainsi, on parle de conditions "michaëliennes" de réaction (température optimale,

pH optimal, substrat non limitant), qui conduisent à une vitesse de réaction et à une affinité enzyme-substrat maximales.

Classiquement, l'étude des cinétiques et des réactions enzymatiques prend appui sur l'expression de ces différentes valeurs. Or, dans le cas d'un système bi-enzymatique ( $E_1$  et  $E_2$ ), nous avons deux enzymes actives sur deux substrats que l'on peut représenter à l'aide des équations suivantes (Dixon and Webb, 1979) :



Chaque équation possède sa vitesse et sa constante de Michaëlis, qui s'ajoutent ou se combinent pour exprimer la vitesse et la constante de la réaction, de façon globale pour l'ensemble du couple enzymatique, sans différenciation possible. On parlera donc de  $V_m$  apparent pour ce double système enzymatique.

De plus, les conditions michaëliennes ne sont pas respectées par le fait que le substrat de la deuxième réaction se trouve limitant, puisqu'il est le produit de la première réaction.

Par conséquent, l'étude théorique de notre réaction enzymatique reste délicate, voire impossible et les constantes  $V_m$  et  $K_m$  ne seront donc pas exprimées dans ce travail.

### 3- Etude bibliographique du système enzymatique

Préalablement aux dosages, nous avons mené une étude bibliographique qui visait deux objectifs :

- bien situer notre enzyme dans la classification établie par le "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry". L'ouvrage de Dixon and Webb (1979), constitua notre principale source d'information.

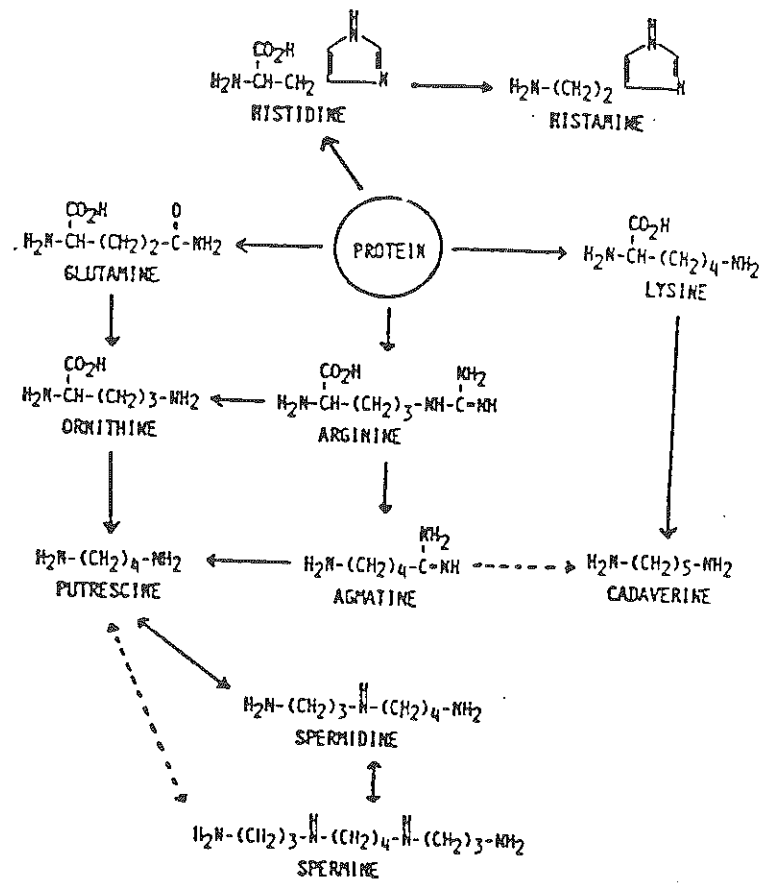
- envisager l'utilisation éventuelle d'une autre enzyme ou d'un autre système réactionnel très spécifique de l'histamine.

**DIAMINE OXYDASE**  
(Diamine : oxygène oxydoréductase)

1-4-3-6

<u>Source</u>	<u>Substrat</u>	<u>Vitesse relative</u>	<u>pH</u>
pousse de pois	Putrescine	1.00	7.0
	Spermidine	0.35	7.0
	Tyramine	0.18	8.5
	Histamine	0.05	7.0

**Tableau n°18** : Diamine oxydase : 1-4-3-6 (D'après Barman, 1969).



**Figure n°2** : Processus général de formation de l'histamine, putrescine, cadavérine, spermine, spermidine et agmatine attribué à l'action enzymatique bactérienne (d'après Karmas and Mietz, 1978).



## PREMIERE PARTIE - TRAVAUX ANTERIEURS

### I - STRUCTURE - FORMATION - ORIGINE DE L'HISTAMINE ET DES AMINES BIOGENES.

#### 1 - Structure chimique des amines biogènes et en particulier de l'histamine

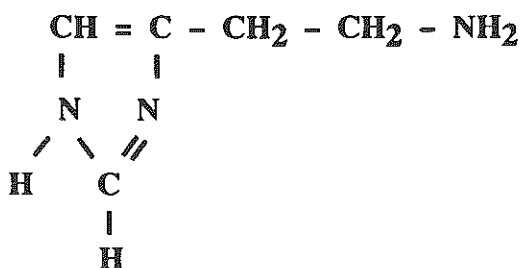
Les amines biogènes sont des bases organiques, aliphatiques, alicycliques ou hétérocycliques de faible poids moléculaire (Askar and coll., 1986). Dans le domaine agro-alimentaire, le terme "amines biogènes" est surtout employé pour désigner les amines non volatiles telles que :

- Putrescine - Cadavérine - Spermine - Spermidine - Agmatine : amines aliphatiques.

- Histamine - Tyramine - Tryptamine : amines aromatiques.

L'histamine, de formule brute  $C_5H_9N_3$ , est également appelée 2-(4-imidazol)-éthylamine. C'est une base organique alicyclique, de faible masse moléculaire (MM = 111,15).

Sa structure développée se présente ainsi :



Elle présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes (Chauchaix et Pailler, 1980) :

- solubilité dans l'eau, l'alcool et le chloroforme à chaud,
- solubilité modérée dans l'éther (Merck Index),
- U.V. négative,
- forte polarité,
- peu volatile,
- identifiable par chromatographie de partage.
- résistante à + 210°C.

La classification se présente de la façon suivante :

### Oxydoréductase

1 - 4 - Active sur le groupe CH - NH<sub>2</sub> donneur d'hydrogène : biocapteur d'oxygène (O<sub>2</sub>). Il s'agit d'acide aminé déshydrogénase ou d'amine oxydase.

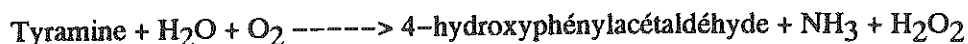
Il y a formation d'ammoniac (NH<sub>3</sub>).

1 - 4 - 3 - Groupe ayant l'oxygène comme accepteur d'hydrogène.

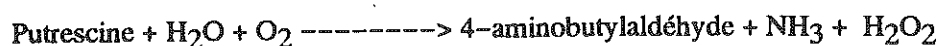
1 - 4 - 3 - 6 - Sous groupe Amine oxydase (contenant du cuivre)



1 - 4 - 3 - 9 - Sous groupe Tyramine oxydase



1 - 4 - 3 - 10 - Sous groupe Putrescine oxydase



L'enzyme qui nous permet de doser les amines biogènes s'avère donc être une amine oxydase de code EC 1-4-3-6. Elle présente l'avantage de permettre un dosage large des amines biogènes contrairement à la Tyramine oxydase ou à la Putrescine oxydase, plus spécifiques. Toutefois, un inconvénient persiste, cette large activité va certainement réduire la spécificité stricte de l'enzyme par rapport à l'histamine.

En effet, le tableau n° 18 présenté par Barman (1969) met en évidence les nombreux substrats de la diamine oxydase au sens large.

Nous voyons que la putrescine, la spermidine et la tyramine sont également des substrats de la diamine oxydase. On peut toutefois penser que la tyramine n'interférera pas, de par la valeur de son pH optimal. Or, chaque substrat ayant des conditions de dosage proches, il faudra s'appliquer à ne doser que l'histamine.

Cette constatation nous a conduit à rechercher parmi les produits commercialisés, l'existence d'une autre enzyme à activité histaminique spécifique : une **histaminase**.

Notre investigation, peu concluante, s'est orientée vers diverses sociétés :

- Boehringer,
- Gist Brocades et Rapidase,
- Aldrish,
- Sigma.

Réactifs	Ordre d'incorporation	Concentrations (mg/ml)	Manipulation en plaque ( $\mu$ l)
LCV	1	0,5	15
Solution à doser	2	--	150
HRP	3	0,1	75
PDAO	4	5,0	75
volume total	--	--	315

**Tableau n°19 : Volumes des réactifs**

Sigma s'est avéré être le seul revendeur et la référence proposée était précisément celle préconisée par Lerke and coll. (1983). Nous en sommes donc restés à ce protocole et nous avons choisi de l'optimiser.

#### 4 - Dosage enzymo-colorimétrique

La lecture colorimétrique de l'absorbance, classiquement effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre, est ici transposée à un lecteur de plaques, impliquant de nombreuses adaptations paramétriques.

Le recours à l'utilisation d'une gamme d'étalonnage nous sert de référence pour optimiser et valider ce dosage.

##### 4 - 1 - Paramètres instrumentaux

La particularité de ce spectrophotomètre repose sur trois points principaux :

- la lecture verticale,
- la lecture en plaques de microtitration standardisées, de 96 puits (ou cupules), à capacité limitée (Polylabo 15018, annexe 4),
- la longueur d'onde déterminée à l'aide de filtres.

Il est donc impératif d'adapter notre dosage et de redéfinir :

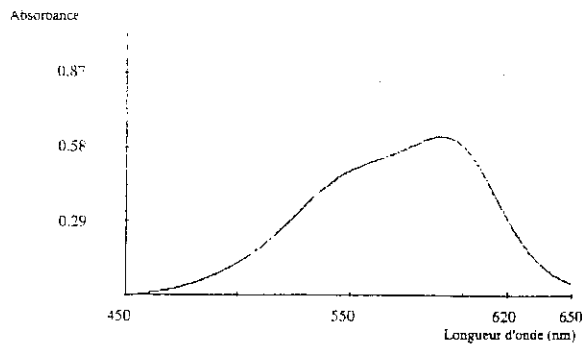
- les volumes de réactifs mis en présence,
- leur ordre d'incorporation dans les cupules,
- le trajet optique induit par le volume réactionnel,
- la longueur d'onde.

##### 4 - 1 - 1 - Volumes des réactifs - Ordre d'incorporation

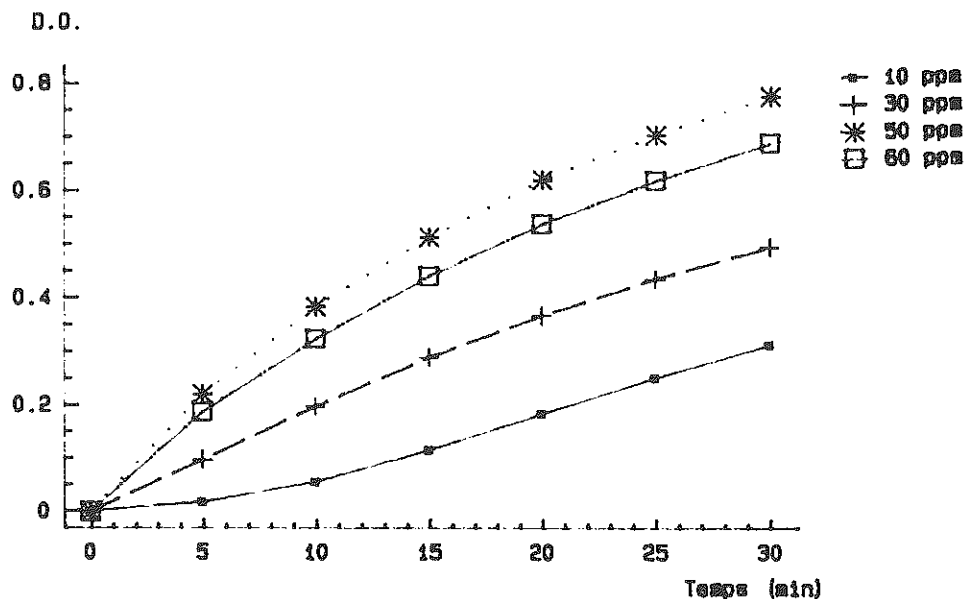
Chaque cupule pouvant contenir 380  $\mu$ l maximum, nous gardons les proportions des réactifs. Volontairement, nous choisissons de ne pas remplir le puits, mais de laisser un espace libre, afin de permettre une agitation après incorporation des réactifs, sans risque de débordement.

Les volumes de réactifs retenus et leur ordre d'incorporation sont présentés sur le tableau n°19.

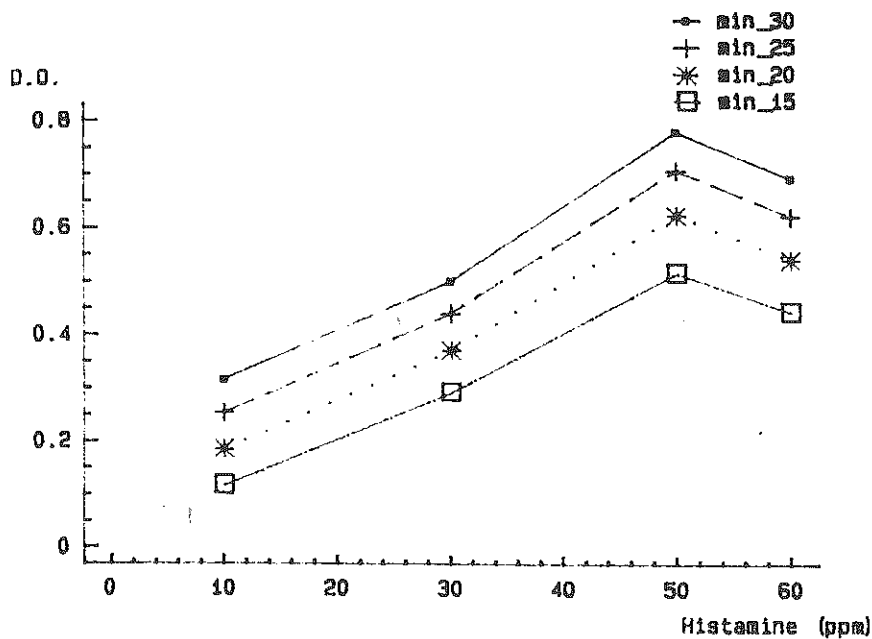
La diamine oxydase est volontairement introduite au dernier moment. Nous considérons que la réaction ne peut démarrer qu'en sa présence. Nous admettons donc que le



**Figure n°13 :** Spectre d'absorption de l'histamine dans les conditions du dosage.



**Figure n°14 :** Courbes représentant l'évolution de la densité optique en fonction du temps  
Lecture au spectrophotomètre à 550 nm.



**Figure n°15 :** Courbes représentant l'évolution de la densité optique en fonction  
de la concentration en histamine. Lecture au spectrophotomètre à 550 nm.

départ de la réaction se fait pratiquement au même temps zéro dans toutes les cupules, aux erreurs de manipulation près.

Le remplissage des plaques se fait en série, à l'aide de pipettes automatiques de précision multicanaux permettant la distribution des réactifs dans les 8 puits simultanément (annexe 3).

#### 4 - 1 - 2 - Trajet optique

D'après la loi de Beer Lambert :  $DO = \epsilon \cdot l \cdot c$ , et puisque la lecture se fait verticalement, le trajet optique  $l$ , est déterminé par le volume de solution présente dans la cupule et non par la longueur de la cuve.

Ainsi, une cupule pleine, soit  $380 \mu\text{l}$ , représente un trajet optique  $l = 10 \text{ mm}$ . Par conséquent, pour un volume réactionnel de  $315 \mu\text{l}$ , le trajet optique prend la valeur de  $8,18 \text{ mm}$  et implique une absorbance inférieure.

L'utilisation de pipettes de précision, nous laisse à penser que le trajet optique est constant, aux erreurs de manipulation près.

#### 4 - 1 - 3 - Longueur d'onde

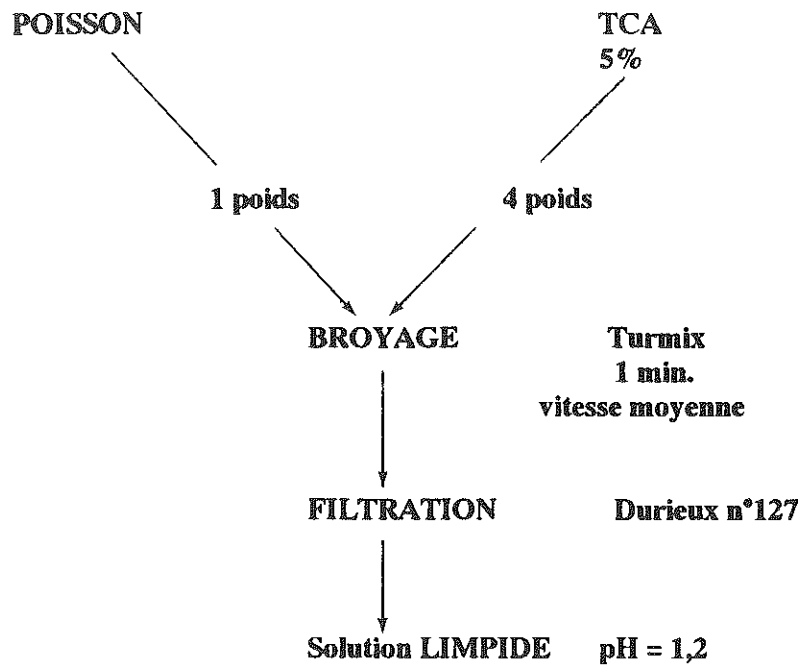
Cet appareil est équipé de filtres et non de lampes, ce qui limite la gamme de longueurs d'onde à :  $320 - 405 - 450 - 550 - 620 \text{ nm}$ .

Il n'est pas équipé d'un filtre de  $\lambda = 596 \text{ nm}$ , comme le recommandent Lerke and coll. (1983), mais de deux filtres de valeur algébrique proche  $\lambda = 550$  et  $\lambda = 620 \text{ nm}$ . A l'aide d'un spectrophotomètre à lampe (Shimadzu), nous établissons le spectre d'absorption de la réaction (Figure n°13).

Notre choix porte donc sans hésitation, sur le filtre de longueur d'onde égale à  $550 \text{ nm}$ , où l'absorbance est relativement élevée et proche (78%) du pic maximum d'absorbance remarqué à  $596 \text{ nm}$ .

#### 4 - 2 - Paramètres analytiques

Ces ajustements entraînent de nombreuses modifications fondamentales par rapport au protocole original. D'un point de vue quantitatif, les premiers essais que nous réalisons sur des solutions standards d'histamine ( $10 - 30 - 50$  et  $60 \text{ ppm}$ ), selon le protocole précité (tableau n°19,  $\lambda = 550 \text{ nm}$ , à température ambiante et sur 30 minutes de cinétique), laissent apparaître un défaut de proportionnalité entre l'intensité de la coloration développée et la concentration en histamine (Figures n°14 et n°15). Ces conditions analytiques ne sont donc pas utilisables pour un dosage quantitatif. Nous choisissons de redéfinir certains paramètres, dans les conditions de notre analyse. Ainsi, la température et les concentrations des réactifs sont ajustées par la méthode des plans d'expériences. Mais avant tout, l'extraction est optimisée et la gamme étalon fixée.



**Figure n°16** : Protocole d'extraction au TCA, de l'histamine dans le poisson.

Gamme d'histamine (ppm)	Banc 0	5	10	15
D.O. à T =0 min.	0,988	0,000	0,000	0,012
D.O. à T =10 min.	1,073	0,000	0,000	0,005
D.O. à T =20 min.	1,177	0,000	0,000	0,009
D.O. à T =30 min.	1,218	0,000	0,001	0,003

**Tableau n°20** : Evolution des densités optiques de la gamme d'histamine après extraction au TCA (pH = 1,2) – Coloration blanchâtre.

#### 4 - 3 - Optimisation de l'extraction

Les connaissances bibliographiques relatives à l'extraction de l'histamine dans le poisson, nous ouvrent plusieurs voies :

- extraction aqueuse (Lerke and coll., 1983),
- extraction à l'acide trichloracétique : TCA (Ritchie and coll., 1989),
- extraction au tampon phosphate à pH=6,8.

##### 4 - 3 - 1 - Extraction à l'eau

Nous reproduisons l'extraction telle que le proposent Lerke and coll. (1983), poids à poids (eau + poisson).

Deux types de problèmes apparaissent :

- broyat trop épais et pâteux, qui n'offre la possibilité de recueillir que très peu de filtrat,
- filtrat trouble et opaque, mais de pH proche de 6,0 qu'une simple dilution volume à volume (au 1/2), à l'aide du tampon phosphate 0,15 M, pH = 6,8 permet de rétablir à un pH de 6,8.

##### 4 - 3 - 2 - Extraction au TCA

Ce protocole d'extraction (poisson / TCA : 1/4) est couramment utilisé lors du dosage des amines biogènes par Chromatographie Liquide Haute Performance.

Le mode opératoire est présenté par la figure n°16. Les défécats obtenus sont limpides et de couleur jaune pâle. Nous réalisons ensuite le dosage enzymo-colorimétrique et nous nous heurtons au problème suivant :

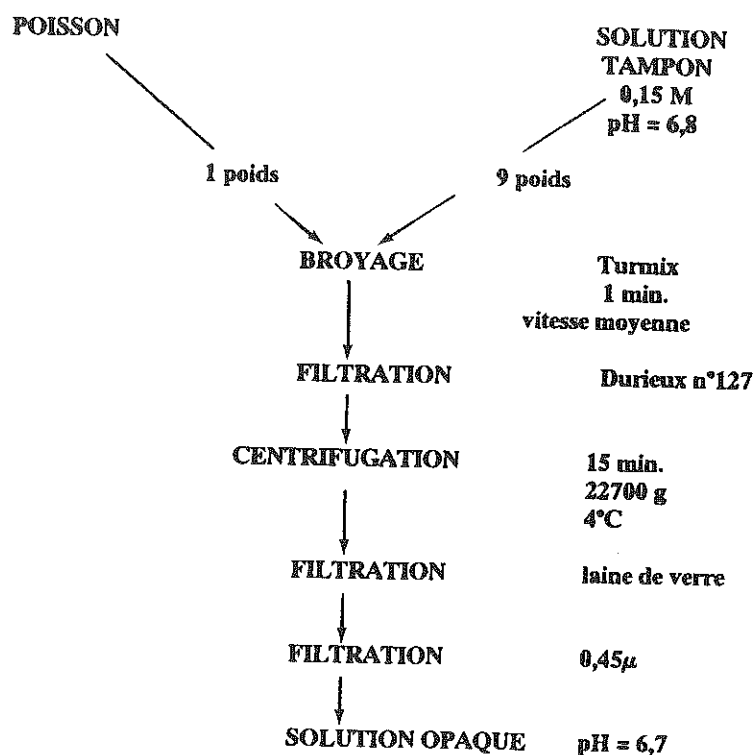
- le pH de l'extrait est très acide : pH = 1,2. Dosé en l'état, il ne permet pas le développement de la coloration bleue : les cupules, de couleur blanchâtre, présentent un léger trouble. De plus, la densité optique des cupules du "blanc", évoluent beaucoup au cours du temps, ce qui explique les valeurs décroissantes de densités optiques observées en cinétique sur 30 minutes (Tableau n°20).

Nous envisageons donc la neutralisation du pH de l'extrait, à l'aide d'un tampon phosphate de pH > 6,8. Or, la dilution engendrée prend des proportions démesurées, conduisant à une dilution de l'ordre du 1/700<sup>e</sup>.

##### 4 - 3 - 3 - Extraction au tampon

Une dilution du poisson au dixième (poisson / tampon : 1/9) est effectuée dans une solution tampon phosphate 0,15 M à pH = 6,8. Le tout est broyé en vitesse moyenne durant 1 minute. Le mélange est ensuite filtré grossièrement sur filtre Durieux n° 127. D'aspect très trouble, et opaque, le filtrat est centrifugé à 4°C pendant 15 min. à 22 700 g.





**Figure n°17** : Protocole d'extraction au Tampon, de l'histamine dans le poisson.

Temps (min.)	0	5	10	15	20	25	30	60	90	120
Densité Optique	0,165	0,165	0,166	0,167	0,170	0,171	0,172	0,184	0,241	0,351

**Tableau n°21** : Cinétique d'évolution de la densité optique, dans la cupule représentant le blanc, malgré l'absence de coloration. Extraction au tampon pH=6,8.

Type d'extraction	Eau	TCA	Tampon
Dilution	1/2	1/5	1/10 <sup>e</sup>
pH de l'extrait	6,0	1,2	6,6 - 6,7
Aspect de l'extrait	Opaque	Limpide	Opaque
Dilution nécessaire pour ajuster le pH à 6,8	1/2	1/700 <sup>e</sup>	néant

**Tableau n°22** : Bilan des essais d'extraction.

Le surnageant récupéré présente un voile de matière grasse en surface, qui est retenu par filtration sur laine de verre.

Ainsi clarifié, l'aspect du surnageant est pratiquement limpide et son pH tamponné est de 6,69 – 6,70. Cet extrait sera extemporanément clarifié sur filtre à usage unique de 0,45  $\mu$ . L'ensemble de ces opérations est récapitulé sur la figure n°17. Cependant, la clarification de l'extrait reste impossible, en dépit des techniques successives de séparation (centrifugation et filtrations), mises en oeuvre. Ce dernier reste relativement opaque et la cupule du blanc présente une densité optique élevée, en absence de coloration toutefois (Tableau n°21). De plus, elle évolue constamment dans le temps, même après 120 minutes de cinétique.

#### 4 – 3 – 4 – Bilan des différents essais d'extraction testés

Fort de ces observations, notre choix porte sur l'optimisation plutôt que sur la recherche d'autres techniques d'extraction. Un bilan des trois manipulations réalisées est établi, en présentant pour chacune, les points positifs et négatifs. Comme il apparaît sur le tableau n°22, le filtrat TCA est parfaitement limpide, par contre, la valeur très basse du pH entraîne le rejet de cette méthode d'extraction.

Nous retenons donc que le pH n'est pas l'inconvénient majeur, mais qu'il faut par contre s'interroger sur la nature du trouble.

La prise en considération de la composition biochimique des poissons nous conduit à émettre l'hypothèse suivante : "Le trouble est probablement de nature protéique".

Une démarche de mise en évidence des protéines, simple et quantitative est alors appliquée.

#### 4 – 3 – 5 – Mise en évidence des protéines extraites

Un kit de dosage des protéines totales par la méthode de Biuret (Merck 3327, protocole annexe 5), nous permet d'effectuer le dosage des protéines dans les extraits de poisson.

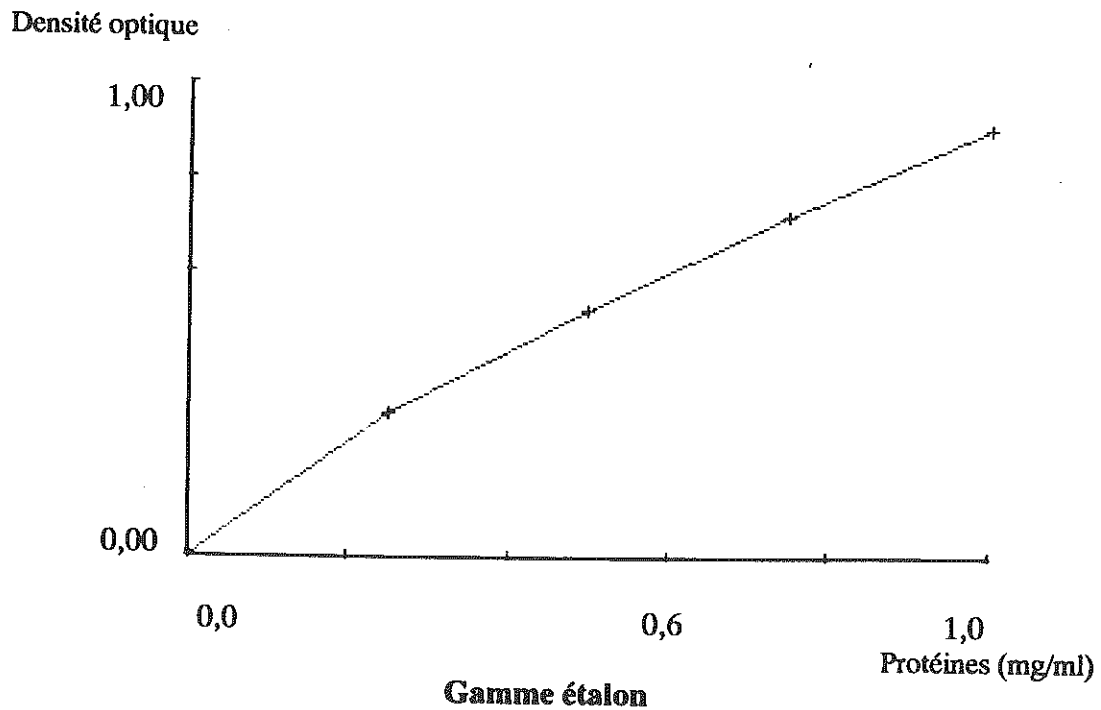
Le principe du dosage est basé sur l'aptitude qu'ont les protéines ou les peptides, à former un complexe de couleur violette, en présence d'ions cuivreux ( $\text{CuSO}_4$ ), en solution alcaline ( $\text{NaOH}$ ). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de liaisons peptidiques et de fonctions amines présentes.

Certains échantillons présentent un trouble, de ce fait, nous effectuons un essai à blanc pour la solution étalon et pour les échantillons. Puis, nous suivons le protocole présenté en annexe 5, en appliquant l'équation suivante :

$$\text{Concentration en protéines} = \frac{\text{D.O. échantillon} - \text{D.O. essai à blanc de l'échantillon}}{\text{D.O. étalon} - \text{D.O. essai à blanc de l'étalon}}$$

Essais	Eau		TCA		Tampon		Etalon	Essai à blanc de l'étalon
	Echantillon	essai à blanc	Echantillon	essai à blanc	Echantillon	essai à blanc		
D.O.	0,032	0,013	0,010	0,006	0,096	0,096	0,306	0,001
Protéines totales (mg/ml)	3,8		0,8		0,0		60,0	0,0
Aspect	léger trouble		limpide		trouble		limpide	limpide

**Tableau n°23** : Dosage des protéines totales dans les extraits de poisson.  
Méthode de Biuret.



Echantillons	Eau	TCA	Tampon
Protéines (mg/ml)	2,16	0,58	1,89
Aspect	trouble	limpide	très trouble

**Valeurs des densités optiques des échantillons**

**Figure n°18** : Résultats fournis par le micro-dosage des protéines par la méthode de Lowry.

Les résultats obtenus figurent sur le tableau n° 23. Constatant les limites de cette méthode : gamme de dosage de 1 à 5 mg/ml et problème du trouble des échantillons, rendant le calcul nul (cas de l'extrait dans le tampon), nous décidons de réaliser un micro dosage des protéines (gamme de dosage de 0 à 1 mg/ml), par la méthode de Lowry, à l'aide d'un kit de dosage (Sigma 690, protocole annexe 6).

Ce dosage est effectivement un dérivé de Biuret, plus sensible toutefois. Par contre, sa spécificité est moindre puisqu'il ne dose que les protéines renfermant des acides aminés aromatiques : Tyrosine, Tryptophane, et accessoirement Cystéine (Mouranche, 1981). Accompagné d'une gamme étalon, il nous fournit les renseignements décrits sur la figure n° 18.

Nous remarquons que malgré le trouble prononcé présent dans l'échantillon d'extraction tampon, le dosage des protéines est possible par la méthode de Lowry, contrairement à la méthode de Biuret. Cet extrait contient d'ailleurs une quantité non négligeable de protéines, de même que l'échantillon d'extraction à l'eau.

En ce qui concerne les échantillons eau et TCA, les résultats semblent assez cohérents avec ceux obtenus par la méthode de Biuret.

Nous expliquons la réaction positive de l'extrait TCA, par la présence de peptides qui ne précipiteraient pas au contact du TCA, contrairement aux protéines. Dans ce cas particulier, le trouble est probablement de nature peptidique.

Fort de ces constatations, nous décidons de remédier à l'opacité des extraits, en éliminant les protéines ou les peptides présents. Nous recherchons donc à les précipiter.

#### 4 - 3 - 6 - Précipitation des protéines

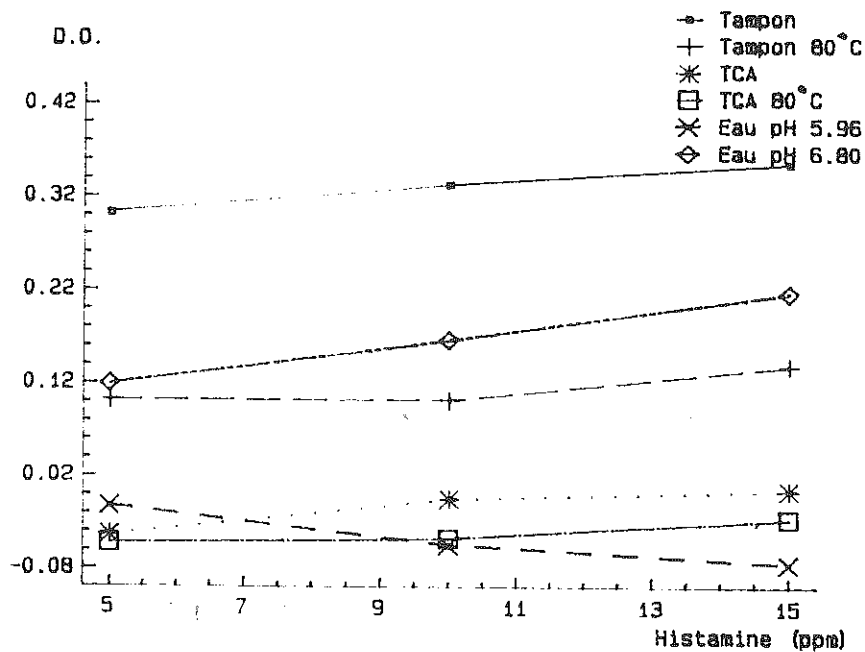
Il est important de rappeler qu'on entend par précipitation, une diminution de la solubilité.

Une recherche bibliographique nous permet de dresser une liste des différentes méthodes de précipitation des protéines :

- précipitation saline : Relargage ou Salting out (variation de la force ionique)  
ex. de réactif : sulfate d'ammonium.
- précipitation isoélectrique : minimum de solubilité des protéines aux valeurs de pH voisines de leur point isoélectrique.
- précipitation par des solvants organiques  
ex. : alcool, acétone, acide trichloracétique à basse température.
- formation de complexes avec :
  - des ions métalliques : acétate de zinc,
  - des polymères non ioniques : dextrane, polyéthylène glycol,
  - des polyélectrolytes ioniques : alginates, carraghénanes ...

Extraits avec ou sans chauffage	Eau		TCA		Tampon	
	Avec	Sans	Avec	Sans	Avec	Sans
Protéines (mg/ml)	2,15	2,16	0,68	0,58	2,11	1,89
pH	5,96	6,00	1,06	1,06	6,68	6,68
Aspect	limpide	trouble	limpide	léger trouble	trouble	très trouble

**Tableau n°24** : Dosage des protéines totales - Méthode de Lowry - dans les différents extraits eau, TCA et tampon, avec ou sans chauffage du broyât.



**Figure n°19** : Lecture après 30 min. de cinétique des réactions colorimétriques des différentes extractions à l'eau, au TCA et au tampon, avec ou sans chauffage à 80°C.

- action de la température : on peut alors assister à une dénaturation des protéines (chauffage ou congélation).

Sachant que les amines biogènes et en particulier l'histamine sont thermostables (Chauchaix et Pailler, 1980), nous ne risquons pas de les altérer en employant la méthode la plus simple à mettre en oeuvre, à savoir : le **traitement thermique**.

Les trois broyâts (eau + poisson; TCA + poisson; tampon + poisson), sont donc placés 10 minutes au bain marie à 80°C, puis refroidis et filtrés. Hormis l'extrait tampon, les deux autres filtrats sont alors parfaitement limpides. Leur dosage rapide, par la méthode de Lowry permet de mettre en évidence la présence de protéines (Tableau n°24).

Corrélativement, nous effectuons les dosages enzymo-colorimétrique sur ces différents essais, après 30 minutes de cinétique (Figure n°19). Nous ne jugeons pas nécessaire de doser l'extrait à l'eau non chauffé, par contre, nous comparons les réactions en fonction des valeurs de pH de cet extrait aqueux chauffé.

Au regard de ces données (tableau n°24 et figure n°19), nous pouvons remarquer que :

- le traitement thermique réalisé en vue de clarifier les extraits n'est réellement efficace que dans le cas des extractions à l'eau et au TCA.

- la teneur en protéines reste sensiblement invariable malgré le traitement thermique.

- le pH est un facteur déterminant sur le développement de la coloration lors de la réaction enzymatique.

- les solutions très troubles absorbent énormément, ce qui se traduit par des valeurs de densité optique élevées.

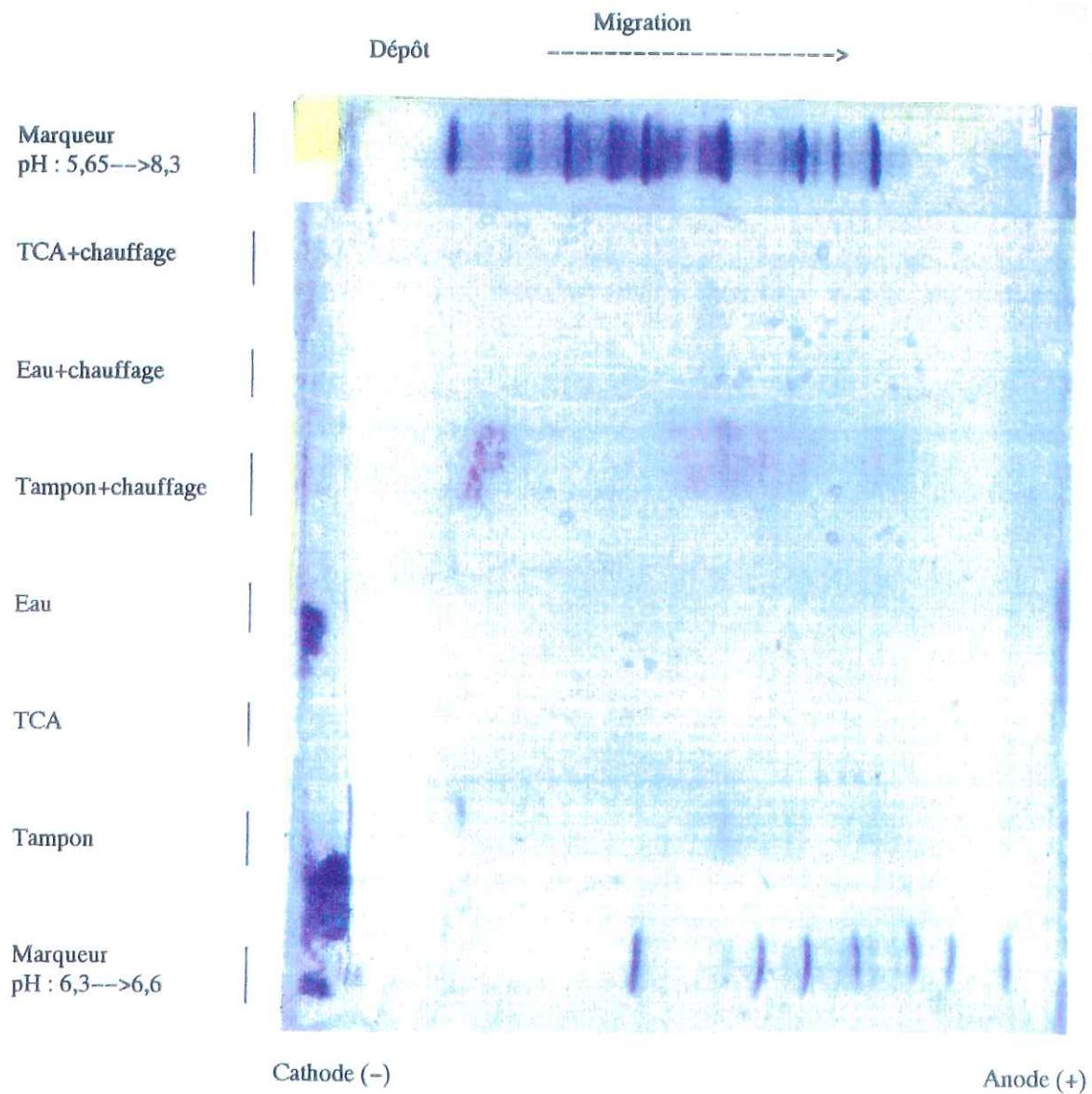
Dubitatifs face à ces observations, nous décidons d'effectuer un profil électrophorétique de ces extraits.

#### 4 - 3 - 7 - Electrophorèse

Rappelons que l'électrophorèse est un phénomène de mouvement des molécules ou particules chargées électriquement, sous l'influence d'un champ électrique, dans un fluide. L'application la plus fréquente est la séparation des protéines, en fonction de leur état d'ionisation, par rapport à leur point isoélectrique, ou bien en fonction de leur forme ou encombrement moléculaire.

Sur notre échantillon, nous réalisons une isoélectrofocalisation, c'est-à-dire un fractionnement des protéines selon leur point isoélectrique, à l'aide d'un gel à gradient de pH (3,5 - 9,5).

Les conditions expérimentales sont présentées en annexe 7.



**Figure n°20** : Electrophorèse des différentes extractions.

Temps (min.)	0	5	10	15	20	25	30	60	90	120
Densité Optique	0,089	0,099	0,108	0,117	0,125	0,132	0,139	0,165	0,181	0,193

**Tableau n°25** : Cinétique d'évolution de la densité optique dans la cupule représentant le blanc malgré l'absence de coloration – méthode d'extraction retenue.

Nous obtenons l'électrophorèse suivante : figure n°20.

Nous constatons que seuls les essais d'extraction au tampon sont légèrement visualisables. De plus, l'échantillon qui n'a pas subi de chauffage à 80°C, n'apparaît qu'à l'état de traces, ce qui nous laisse supposer que le chauffage provoque des agrégations protéiques, plus visibles en électrophorèse.

Les essais au TCA ne révèlent rien en électrophorèse. Ils sont très faiblement concentrés d'une part, et leur pH est très acide d'autre part.

Les extraits à l'eau, de concentration identique aux extraits tampon, ne sont pas visibles toutefois. Ce phénomène n'est donc pas interprétable d'un point de vue quantitatif. Nous optons plutôt pour une explication qualitative, considérant que la nature des protéines extraites est différente selon le type de solvant utilisé :

- extraction des protéines sarcoplasmiques à l'eau,
- extraction des protéines myofibrillaires au tampon.

A cet argument, peut s'ajouter la notion de force ionique, variable également.

Nous ne prétendons pas toutefois, avancer ici une démonstration infaillible, notre propos visant essentiellement la formalisation d'hypothèses de travail...

#### 4 - 3 - 8 - Discussion - Méthode retenue

Face à ces diverses observations, nous optons pour les solutions suivantes :

- Rejet de l'extraction au TCA, pour des raisons d'acidification exagérée des extraits.

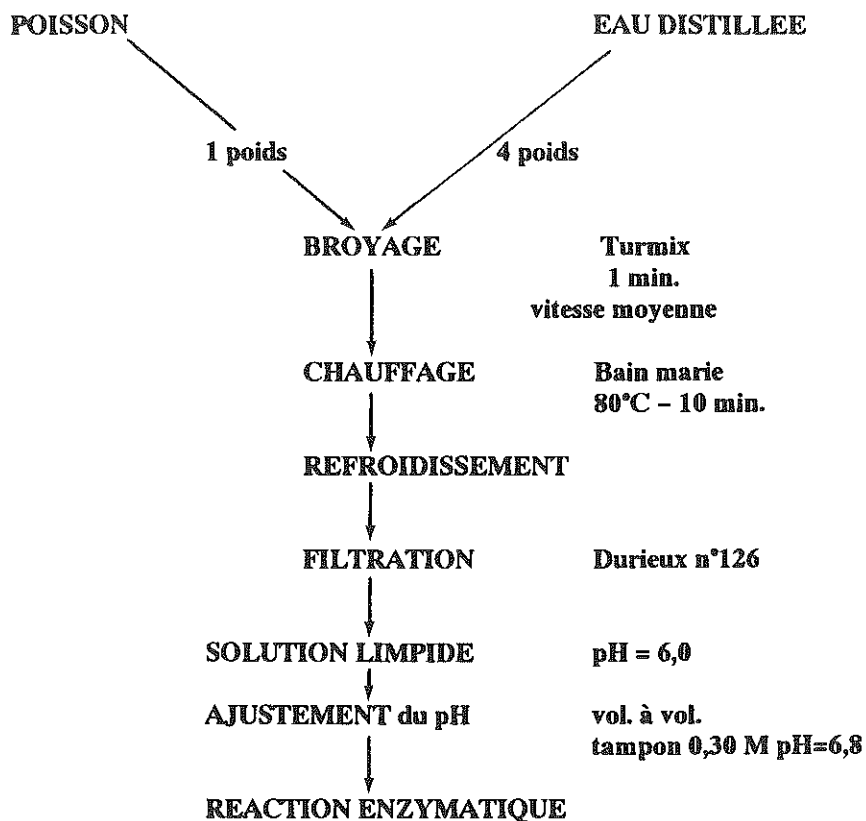
- Rejet de l'extraction au tampon pour des raisons d'opacité de l'extrait, que nous ne parvenons ni à clarifier, ni à stabiliser. De ce fait, l'opacité de la solution entraîne une trop forte absorption par défaut, qui évolue de façon excessive dans le temps.

- Adoption de l'eau comme solvant d'extraction, suivie d'un chauffage provoquant la précipitation ou la floculation des particules gênantes. Ainsi clarifié, l'extrait exempt d'histamine (le blanc), présente une absorption quantitativement modérée, qui progresse légèrement dans le temps (Tableau n°25).

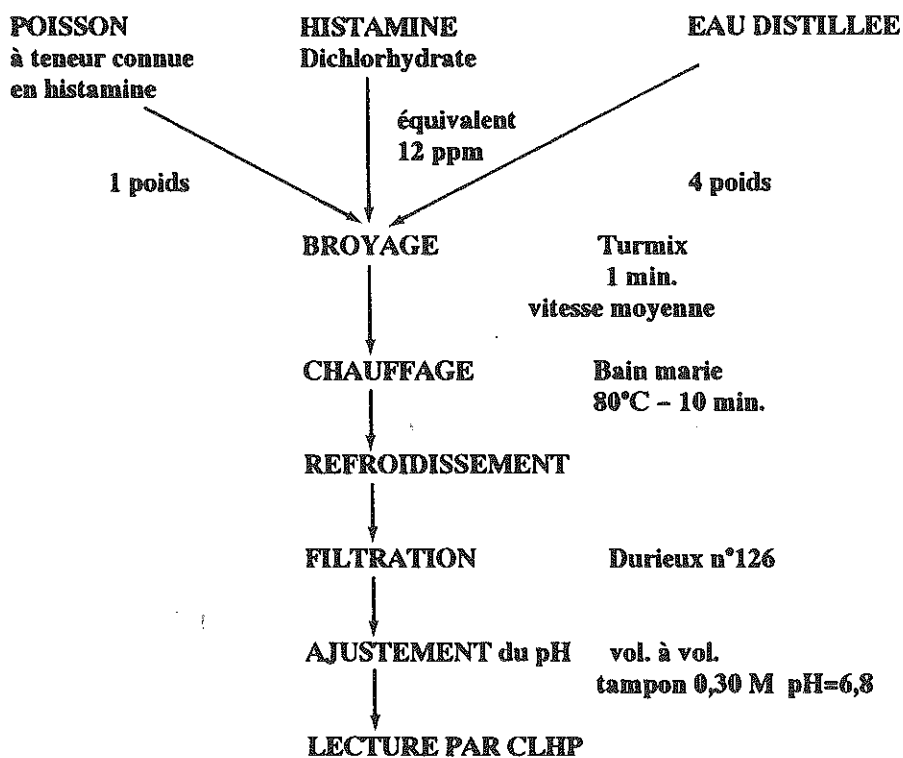
Globalement, la technique d'extraction retenue se présente ainsi :

1 poids de poisson est broyé en présence de 4 poids d'eau distillée (dilution 1/5<sup>e</sup>), en vitesse moyenne durant 1 minute. Le broyat est ensuite placé 10 minutes au bain marie à 80°C. Cette opération provoque la précipitation des protéines qui gêneraient la lecture ultérieure au spectrophotomètre. Après refroidissement, le mélange est clarifié sur filtre Durieux n°126. L'aspect du filtrat est alors limpide, de couleur jaunâtre et son pH est proche de 6,0. Il est ensuite tamponné à pH = 6,8 par une dilution, volume à volume, au tampon phosphate 0,30 M à pH = 6,8. En doublant la molarité du tampon (0,30 M), nous





**Figure n°21** : Protocole d'extraction de l'histamine retenue : Extraction aqueuse.



**Figure n°22** : Protocole d'extraction aqueuse de l'histamine dans le poisson. Vérification du caractère quantitatif par CLHP.

restons dans les conditions de force ionique proches du protocole dont nous nous sommes inspiré.

Ce protocole d'extraction, présenté sur la figure n°21, sera utilisé pour la suite de notre étude. Il implique une dilution au dixième du poisson.

Cet extrait tamponné constitue :

– le solvant de la gamme étalon, en étalonnage externe, s'il est réalisé à partir de poisson frais exempt d'amines.

– l'échantillon à analyser, s'il est réalisé à partir de poisson à doser.

#### 4 – 3 – 9 – Vérification de l'extraction

Nous devons vérifier le caractère fiable mais surtout quantitatif de l'extraction. Pour ce faire, une extraction est réalisée à partir de deux échantillons de thon frais, chargés artificiellement en amines biogènes ( $T_1$  et  $T_2$ ), dont la teneur théorique est vérifiée par calibrations inter-laboratoires.

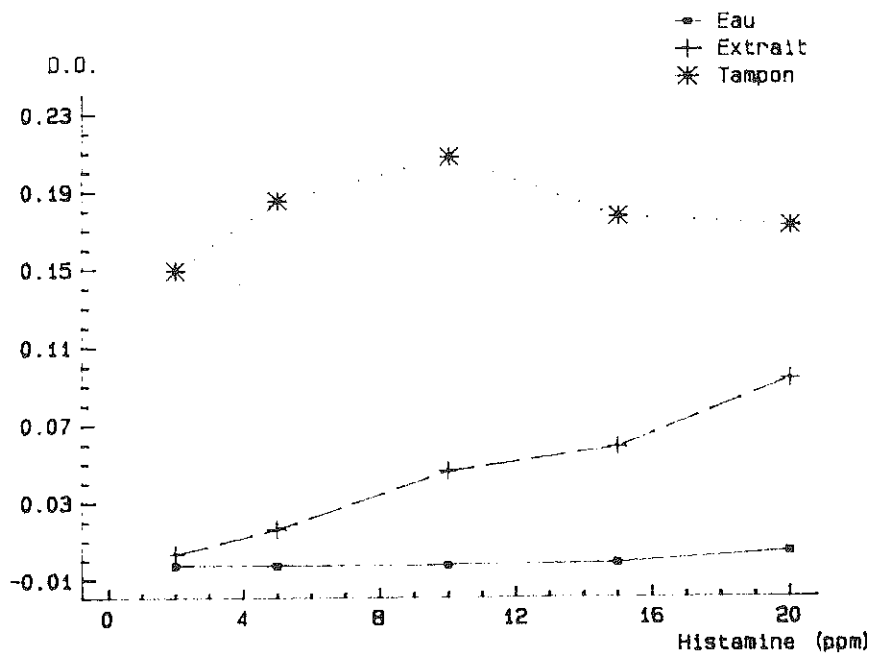
Lors du broyage, nous incorporons une quantité connue et précise d'histamine dichlorhydrate en poudre, équivalente à 12 ppm d'histamine pure dans l'extrait de thon  $T_2$ , soit 120 ppm dans le thon, (figure n°22). Puis, les extraits sont dosés par chromatographie (CLHP) considérée comme méthode de référence, en présence d'une gamme d'étalonnage.

Ainsi, nous apprécions l'aspect quantitatif de l'extraction, de façon classique d'une part et par la méthode des ajouts d'autre part.

Les résultats exprimés par le tableau n°26 montrent que, dans les conditions expérimentales utilisées, l'extraction aqueuse retenue est relativement fiable et quantitative, en dépit de légères fluctuations, probablement dues aux erreurs de manipulations, relatives à la faible quantité d'histamine pesée puis incorporée dans le bol du broyeur lors de l'extraction.

Teneur en histamine dans le poisson (ppm)	Echantillons		
	$T_1$	$T_2$	$T_2$ + surcharge
Théorique (intercalibration)	110,0	44,8	$44,8 + 120,0 = 164,8$
CLHP	110,0	43,2	168,0

**Tableau n°26** : Vérification de l'extraction aqueuse de l'histamine, par CLHP.



**Figure n°23** : Courbes comparées des densités optiques des gammes d'histamine, en fonction du solvant utilisé (30 min.).

Histamine (ppm)	2	5	10	15	20
pH	6,26	5,72	5,60	5,20	4,77

**Tableau n°27** : Valeurs des pH des solutions de la gamme étalon d'histamine solubilisée dans l'eau.

#### 4 - 3 - 10 - Conclusion

Cette démarche d'optimisation de l'extraction se devait d'être minutieuse afin de concevoir avec rigueur la mise au point d'une technique de dosage et de cadrer avec notre objectif initial : **facilité et rapidité**.

Elle s'est avérée longue et progressive mais riche d'informations. En effet, elle nous a permis de confirmer certaines interrogations telles que :

- la vérification du caractère thermostable de l'histamine (stable au moins 10 minutes à 80°C),
- l'incidence directe du pH sur la réaction enzymatique (pH proche de 7),
- l'extraction simultanée à l'histamine, de molécules telles que des peptides ou des protéines du tissu animal.

En conclusion, nous pouvons donc considérer que cette méthode d'extraction de l'histamine est en adéquation avec le but de cette étude : elle est simple et exécutable rapidement.

#### 4 - 4 - Gamme étalon de substrat

L'utilisation d'une gamme étalon repose sur la constitution d'une série de solutions contenant des quantités précises, connues et croissantes, d'histamine. Elle est utilisée en tant que référence au cours du dosage.

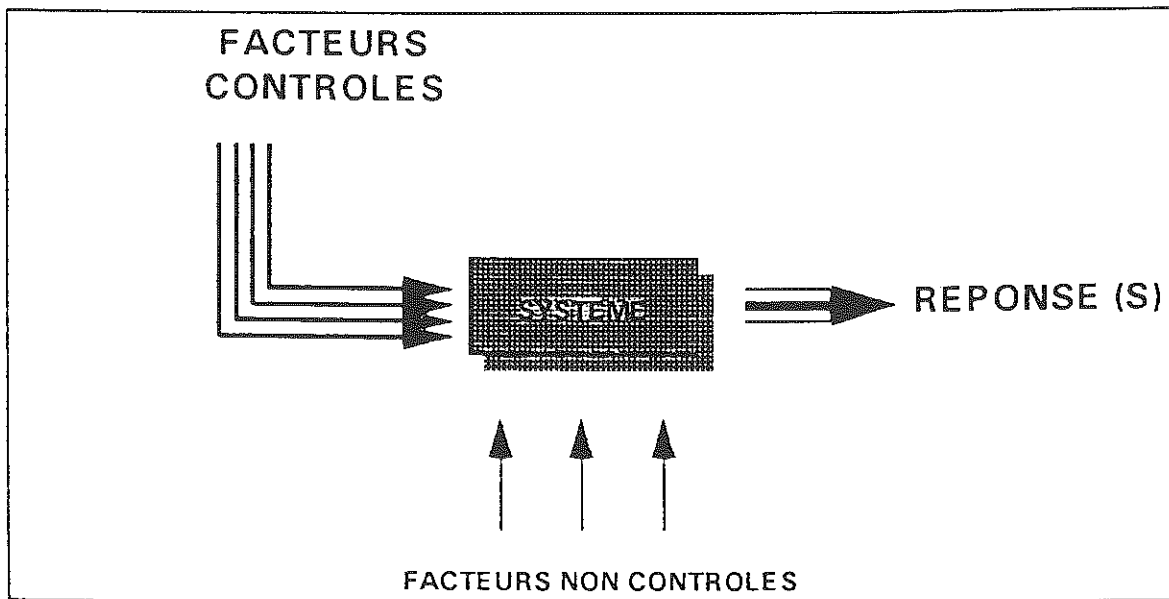
Une cupule de référence servant de "blanc" est réalisée afin de vérifier la pureté des réactifs et leur interaction sur le dosage. Sa préparation suit le protocole de l'analyse dans toutes ses phases. Sa valeur de densité optique est systématiquement défalquée de celle des échantillons.

Plusieurs solvants de l'histamine sont testés :

- l'eau distillée,
- le tampon pH = 6.8,
- l'extrait de poisson.

Chaque gamme d'étalonnage fait l'objet d'un dosage colorimétrique représenté par la figure n°23, après 30 minutes de cinétique.

Nous observons que l'histamine dissoute dans de l'eau distillée, ne développe pas de coloration : les cupules restent incolores. Ces remarques s'expliquent très bien en s'attachant aux valeurs de pH des différents puits (Tableau n°27). Il apparaît en effet, que plus la teneur en histamine est forte, plus le pH est faible et loin du pH optimal de la réaction enzymo-colorimétrique. Les valeurs négatives s'expliquent par le fait que la cupule réactifs (le blanc) absorbe plus que les essais eux mêmes. Ainsi, en retranchant le blanc, les densités optiques prennent des valeurs négatives.



**Figure n°24** : Représentation schématique d'un système expérimental (D'après Courcoux, 1991).

La courbe représentant la gamme étalon d'histamine dissoute dans du tampon est elle, très haute. En effet, un trouble accompagné d'une coloration bleue se développe, ce qui explique des valeurs de densité optique globalement élevées. La chute de densité optique des solutions d'histamine de concentration supérieures à 10 ppm peut s'expliquer par un phénomène de compétition histamine/autres molécules, par rapport aux réactifs, qui se trouvent alors limitants.

Enfin, il apparaît une bonne corrélation (coef. de corr. = 0,99) entre les densités optiques et la teneur en histamine de l'extrait aqueux de poisson. Au regard de ces résultats, l'utilisation de l'extrait poisson exempt d'amines est donc retenu comme solvant de l'histamine.

Un étalonnage dit "externe", ou par la "méthode des ajouts", est réalisé, par solubilisation de l'histamine dichlorhydrate, en quantités connues, dans de l'extrait de poisson limpide et tamponné. Ainsi, les conditions d'environnement de nos échantillons sont reproduites au plus près, en considérant que l'absorbance occasionnée par la présence de substances extraites simultanément, est gommée par la gamme étalon.

Les concentrations de la gamme étalon sont déterminées en adéquation avec les doses d'histamine susceptibles d'être rencontrées dans les poissons ou produits à base de poisson. Ces données nous sont fournies par l'étude bibliographique des teneurs en histamine rencontrées dans les aliments.

Nous tenons compte également de la réglementation européenne de mise sur le marché des produits de la pêche. Nous choisissons donc de travailler à des concentrations inférieures à 200 mg/Kg de poisson (200 ppm). Or, nous appliquons un facteur dix aux valeurs retenues, puisque l'extraction préalable au dosage provoque une dilution au 1/10<sup>e</sup> du produit.

La gamme étalon ainsi retenue varie de 0 à 200 ppm, soit :

\* 0 - 2 - 5 - 10 - 15 - 20 - 30 - ... - 200 ppm.

#### **4 - 5 - Optimisation du dosage enzymo-colorimétrique**

A ce stade de la mise au point, il nous reste à définir les concentrations optimales des différents réactifs, ainsi que la température optimale et le temps de développement de la coloration. La méthode des plans d'expériences est notre principal outil.

##### **4 - 5 - 1 - Principe de la méthode des plans d'expériences**

L'étude d'un dispositif expérimental est fonction d'un certain nombre de facteurs contrôlés ou non et elle procure une ou plusieurs informations appelées réponses (Figure n°24).

Afin de mesurer la grandeur étudiée, la démarche classique de l'expérimentateur est de fixer à tour de rôle le niveau de chacune des variables, en ayant soin de n'en faire varier qu'une seule à la fois. Cette approche ne permet pas de préjuger des interactions possibles entre les différents facteurs. De plus, elle nécessite la mise en place d'un nombre important d'expériences, proportionnel au nombre de paramètres agissant sur la réponse.

L'objectif de chaque expérimentateur est bien d'amasser le maximum d'informations tout en limitant la multiplicité des expériences... C'est là que la méthodologie des plans expérimentaux prend tout son sens.

En effet, à l'aide d'une série d'analyses planifiées et limitées faisant varier tous les paramètres à la fois, elle permet de modéliser et de caractériser le procédé étudié. En choisissant au mieux les expériences à réaliser, nous découvrons les règles d'évolution d'une grandeur d'intérêt en fonction des variables opératoires.

Ainsi, il est souvent possible de réduire le nombre d'analyses et donc d'économiser temps et argent. La modélisation permet d'évaluer les effets individuels des facteurs, mais également les interactions entre deux facteurs.

#### 4 - 5 - 2 - Démarche et Méthodologie

Notre première préoccupation est de choisir le plan expérimental qui nous donne le plus d'informations, pour un nombre réduit d'expériences. Nous avons donc recours aux connaissances bibliographiques, qui nous permettent de définir :

- les facteurs contrôlés,
- le domaine expérimental,
- la réponse expérimentale.

Fort de ces renseignements, nous pouvons choisir un modèle et un plan expérimental.

#### 4 - 5 - 2 - 1 - Choix des paramètres à tester

Nous désirons porter un jugement objectif sur l'influence réelle des différents paramètres :

- Quels facteurs jouent effectivement un rôle non négligeable sur l'expérience ?
- A quels niveaux doit-on les fixer pour obtenir la meilleure réponse ?

La prise en considération des données bibliographiques nous permet de fixer cinq facteurs contrôlés, de la façon suivante :

Quatre facteurs qui évoluent dans le plan :

\* Température de dosage : le lecteur de plaques est muni d'un système de régulation thermique qui assure une ambiance thermostatée à 30 ou 37°C.

\* Concentration en PDAO : enzyme principale, qui agit directement sur le substrat à doser.

\* Concentration en HRP : enzyme secondaire, qui agit sur le produit de la première réaction, entraînant une coloration proportionnelle à la quantité de substrat initial.

\* Concentration en LCV : précurseur de la réaction de coloration.

Un facteur qui évolue à l'intérieur de chaque plan :

\* Temps : relevé toutes les 5 minutes jusqu'à 30 minutes afin de déterminer l'absorbance maximale, tout en restant fidèle à notre objectif initial : **dosage rapide**.

#### 4 - 5 - 2 - 2 - Choix de la réponse expérimentale

La réponse retenue est l'intensité de la coloration développée lors de la réaction enzymatique, soit l'absorbance maximale (exprimée en densité optique D.O.), développée en un temps raisonnable.

#### 4 - 5 - 2 - 3 - Facteurs non contrôlés

Nous considérons que les facteurs non contrôlés peuvent être :

- Température du laboratoire,
- Evaporation des réactifs,
- Intensité de la lampe,
- Etalonnage des pipettes,
- Erreurs de pesées,
- etc.,

et qu'ils sont à la base de l'erreur expérimentale.

#### 4 - 5 - 2 - 4 - Choix du modèle

Les effets d'interactions, entre facteurs, d'ordre supérieur à un nous importent peu, nous retenons donc le polynôme F qui lie les réponses Y aux facteurs  $X_i$  :

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i^2 + \sum a_{ij} X_i X_j + e$$

avec :  
Y = réponses  
X = facteurs  
 $a_0$  = constante  
 $a_i$  = effets principaux des facteurs  
 $a_{ii}$  = effets quadratiques des facteurs  
 $a_{ij}$  = effets d'interactions d'ordre un entre les facteurs  
e = erreur expérimentale.



#### 4 - 5 - 2 - 5 - Choix du plan

Goupy (1990) et Courcoux (1991), nous aident à établir une première liste de plans expérimentaux utilisables dans notre contexte :

- le plan factoriel complet (PFC),
- le plan factoriel fractionnaire (PFF),
- le plan central composite (PCC).

Notre volonté est de tester le plus de paramètres possibles, en gardant un nombre d'analyses raisonnable. De plus, les effets d'interactions d'ordre élevé entre les facteurs ne nous importent pas. C'est pourquoi, il nous semble plus intéressant d'utiliser un plan factoriel fractionnaire dans un premier temps, puis un plan factoriel complet ultérieurement.

En effet, le plan factoriel complet est relativement vaste et procure de nombreuses informations. Or, son inconvénient majeur réside dans la mise en oeuvre d'un trop grand nombre d'analyses. Le recours au plan factoriel fractionnaire revient en fait à utiliser un sous groupe du plan factoriel complet, ce qui réduit considérablement le nombre d'expériences pour un même nombre de facteurs testés.

Exemples comparés du nombre d'expériences à réaliser pour quatre facteurs testés :

$$\text{PFC} : 2^k = 2^4 = 16 \text{ expériences} \quad \text{PFF} : 2^{k-p} = 2^{4-1} = 2^3 = 8 \text{ expériences}$$

Nous optons donc pour un PFF  $2^{k-p}$  soit  $2^{4-1}$  :

$$\begin{aligned} 2 &= 2 \text{ niveaux pris pour chaque facteur (haut (+1) et bas (-1)),} \\ k &= \text{nombre de facteurs testés égal à 4,} \\ p &= 1 \text{ degré.} \end{aligned}$$

Le nombre d'analyses que nous réalisons est donc fixé à huit.

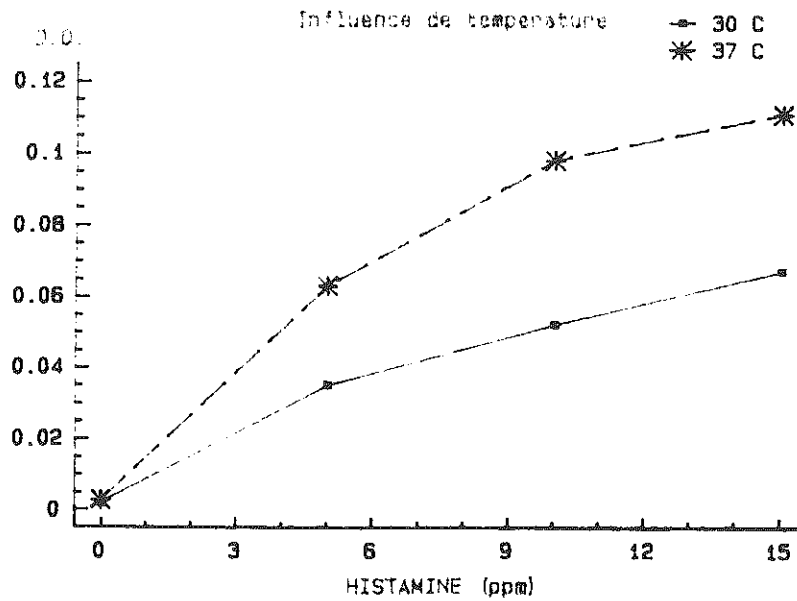
Toutefois, quelque soit le type de plan retenu, nous désirons vérifier la linéarité de la réponse. Pour ce faire, nous définissons un point central pour chaque facteur contrôlé, sauf pour la température, car l'appareil n'offre que deux possibilités de réglage de la température (30°C et 37°C).

#### 4 - 5 - 2 - 6 - Détermination de l'erreur expérimentale

Afin de nous éclairer sur l'erreur expérimentale commise lors du dosage, nous adoptons la démarche suivante :

Tout d'abord, nous dressons la liste des facteurs susceptibles d'induire une erreur:

- le pipetage : distribution des réactifs dans les cupules,
- les pesées et dilutions intervenant lors de la préparation des réactifs,



**Figure n°25 :** Influence de la température sur l'intensité de la coloration, lors de la réaction enzymo-colorimétrique.

Colonnes Lignes	1	2	3	4	5	6	7
A	A	B	C	D	F	H	Bl
B	A	B	C	D	F	H	Bl
C	A	B	C	D	F	H	Bl
D	A	B	C	D	F	H	Bl
E	A	B	C	E	G	I	Bl
F	A	B	C	E	G	I	Bl
G	A	B	C	E	G	I	Bl
H	A	B	C	E	G	I	Bl

A : Extrait Jo + Réactifs Jo

C : Histamine 10 ppm Jo + 2<sup>e</sup> Réactifs Jo

E : Histamine 10 ppm Jo + Réactifs J<sub>+10</sub>

G : Extrait Jo + Réactifs J<sub>+10</sub>

I : Histamine 10 ppm J<sub>+10</sub> + Réactifs J<sub>+10</sub>

B : Histamine 10 ppm Jo + 1<sup>er</sup> Réactifs Jo

D : Histamine 10 ppm J<sub>+1</sub> + Réactifs Jo

F : Extrait J<sub>+1</sub> + Réactifs Jo

H : Histamine 10 ppm J<sub>+10</sub> + Réactifs Jo

Bl : Extrait Jo + Réactifs Jo.

**Tableau n°29 :** Schéma de la plaque - Disposition des solutions sur 8 ou 4 cupules.  
Manipulation de détermination de l'erreur expérimentale.

- le vieillissement des réactifs : l'effet jour.

Puis, nous attribuons aux paramètres étudiés, les valeurs numériques des points centraux. Nous substituons également la gamme d'histamine à une seule solution (10 ppm). Les conditions expérimentales ainsi fixées, figurent sur le tableau n°28.

Histamine (ppm)	Température (°C)	PDAO (mg/ml)	HRP (mg/ml)	LCV (mg/ml)
10	37	7	0,2	0,1

**Tableau n°28** : Valeurs numériques des paramètres utilisés lors de la détermination de l'erreur expérimentale.

La valeur de la température fixée à 37°C, est largement inspirée par nos dosages préliminaires, qui faisaient apparaître une intensité de la coloration supérieure à 37°C plutôt qu'à 30°C (figure n°25).

La détermination des effets de pesées et de dilutions, nous demande la réalisation de deux fois la même série de réactifs, le même jour. Puis, l'effet jour est testé après conservation des réactifs à 4°C de un à dix jours. Globalement, le schéma de notre manipulation se présente sur le tableau n°29.

Ainsi programmée, cette manipulation nous fournit des informations sur les densités optiques de plusieurs ordres, exploitables après 30 minutes de cinétique (tableau n°30) :

Blanc	A	B	C	D	E	F	G	H	I
0,136	-0,002	0,040	0,044	0,208	0,055	0,028	-0,001	0,144	0,171
0,147	0,014	0,035	0,053	0,192	0,069	0,023	0,011	0,147	0,167
0,156	0,012	0,045	0,048	0,211	0,060	0,049	0,002	0,134	0,152
0,154	0,017	0,054	0,065	0,221	0,061	0,045	0,002	0,170	0,157
0,134	-0,010	0,013	0,020	--	--	--	--	--	--
0,158	0,015	0,040	0,040	--	--	--	--	--	--
0,118	-0,002	0,030	0,024	--	--	--	--	--	--
0,108	0,033	0,037	0,040	--	--	--	--	--	--
<b>Moyenne</b>	0,009	0,037	0,042	0,208	0,061	0,036	0,003	0,145	0,162

**Tableau n°30** : Valeurs numériques des densités optiques obtenues lors de la détermination de l'erreur expérimentale.

Séries	A	B	C	D	E	F	G	H	I	BI
Moyenne	0,012	0,037	0,042	0,208	0,061	0,036	0,003	0,148	0,162	0,139
Ecart type	0,012	0,012	0,015	0,012	0,006	0,013	0,005	0,015	0,008	0,018
Coef. de variation	100,0	32,4	35,7	5,7	9,8	36,1	166,6	10,1	4,9	12,9

**Tableau n°31** : Expression de la répétabilité, sur les valeurs de D.O.

Effet de la Sol. testée	Conservation	
	1 jour (*)	10 jours (*)
Réactifs / extrait	0	-
Réactifs / histamine (1 j)	0	+
Réactifs / histamine (10 j)	0	-
Extrait sans histamine	+	0
Histamine 10 ppm	+	+

(\*) + : significativement différent au seuil de 5 %  
 - : Non significativement différent au seuil de 5 %  
 0 : Non évalué

**Tableau n°32** : Détermination de l'effet jour - Test de Fisher.

- répétabilité : cette notion est exprimée par le "coefficient de variation", établi pour chaque série de huit cupules identiques (tableau n°31).

$$\text{coefficient de variation} = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

- erreur de pipettage :

Test T de Student (au seuil de 5 %), sur les valeurs de la colonne A sans retrait des blancs (annexe 8).

Hypothèse : la moyenne des valeurs des essais moins les blancs est nulle.

Réponse : cette moyenne n'est pas significativement différente de zéro au seuil de 5 %.

- erreur commise lors de la préparation des réactifs :

Valeurs des colonnes B et C.

Test T de Student (au seuil de 5 %), intervalle de confiance entre ces deux séries de valeurs (annexe 9).

Hypothèse : différence nulle.

Réponse : échantillons non significativement différents.

- effet jour :

Test F de Fisher : analyse de la variance.

Ce test est réalisé sur les réactifs, l'extrait poisson et la solution d'histamine à 10 ppm (annexe 10).

Réponse : tableau n°32.

En conclusion, nous pouvons avancer que :

- l'erreur de pipettage est non significative au seuil de 5 %.

- l'erreur de préparation des réactifs est non significative au seuil de 5 %.

- l'effet jour est globalement significatif au seuil de 5 %, quelle que soit la solution considérée, ce qui impose la préparation des réactifs et des extraits chaque jour de manipulation.

#### 4 - 5 - 3 - Mise en application - Résultats

Notre première démarche nous ayant permis de définir le contexte et les outils de notre étude, nous envisageons donc la construction des différents plans expérimentaux retenus.

#### 4 - 5 - 3 - 1 - Construction du plan factoriel fractionnaire

Afin de faire varier quatre facteurs, sur deux niveaux chacun, nous avons recours à une écriture matricielle qui représente les essais retenus.

Facteurs	1	2	3	4
Expériences	PDAO	HRP	LCV	Température
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1

**Tableau n°33** : Représentation de la matrice des effets du PFF  $2^{4-1}$ .  
niveau bas (-1)  
niveau haut (+1).

Expériences	Température (°C)	PDAO (mg/ml)	HRP (mg/ml)	LCV (mg/ml)
1	30	7	0,2	0,1
2	37	7	0,2	0,1

**Tableau n°34** : Caractéristiques des séries d'expériences réalisées aux points centraux.

Facteurs	1	2	3	4
Expériences	PDAO	HRP	LCV	Température
1	0	0	0	-1
2	-1	-1	-1	-1
3	+1	-1	-1	+1
4	-1	+1	-1	+1
5	+1	+1	-1	-1
6	-1	-1	+1	+1
7	+1	-1	+1	-1
8	-1	+1	+1	-1
9	+1	+1	+1	+1
10	0	0	0	+1

**Tableau n°35** : Matrice complète du PFF  $2^{4-1}$  et de ses points centraux.

Dans le cas précis du PFF  $2^{4-1}$ , il s'agit d'une matrice des effets également nommée matrice "d'Hadamard" (Tableau n°33). On considère ainsi que le quatrième facteur est étudié sur l'interaction des trois autres (1,2,3). Ce procédé repose en fait sur la théorie des alias : le quatrième facteur est mélangé ou aliasé aux trois autres. Le résultat est donc satisfaisant, seulement si l'interaction aliasée est négligeable devant la valeur de l'effet principal (Goupy, 1990).

Ainsi, le nombre d'expériences est effectivement divisé par deux, par rapport à un plan complet. Néanmoins, les effets calculés ne sont pas purs, mais mélangés aux interactions. Si une interaction est nulle, alors les résultats sont analogues à ceux trouvés en réalisant un plan complet, c'est-à-dire qu'ils sont représentatifs des effets principaux des facteurs.

Toutefois, nous devons noter que l'interprétation des plans factoriels fractionnaires est plus complexe que celle d'un plan complet. Les hypothèses de travail que nous retenons (Goupy, 1988) et qui nous guident dans notre interprétation sont les suivantes:

- les interactions d'ordre supérieur à un sont considérées comme négligeables,
- si un contraste est nul, on suppose que les effets aliasés le sont également,
- si deux effets sont faibles (ou forts), on admet que leur interaction est respectivement faible (ou forte).

Puis, nous désirons compléter cette étude en testant la linéarité des réponses. Pour ce faire, nous définissons deux séries d'analyses en points centraux, une par valeur de température à 30 et à 37°C (tableau n°34).

#### 4 - 5 - 3 - 2 - Domaine expérimental

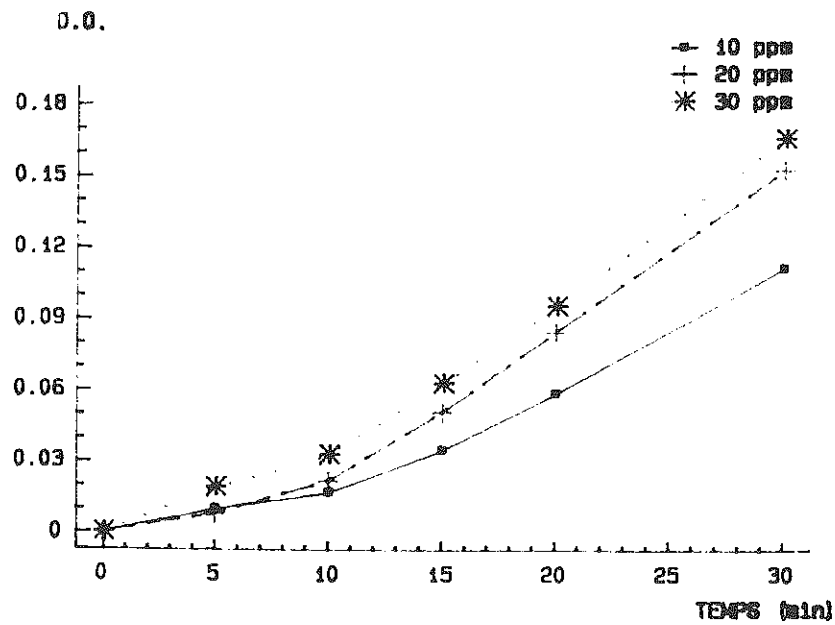
Ainsi programmée, notre étude nécessite la réalisation de dix séries d'expériences :

- huit séries d'expériences selon la matrice d'Hadamard (Tableau n°33),
- deux séries d'expériences présentées par le tableau n°34.

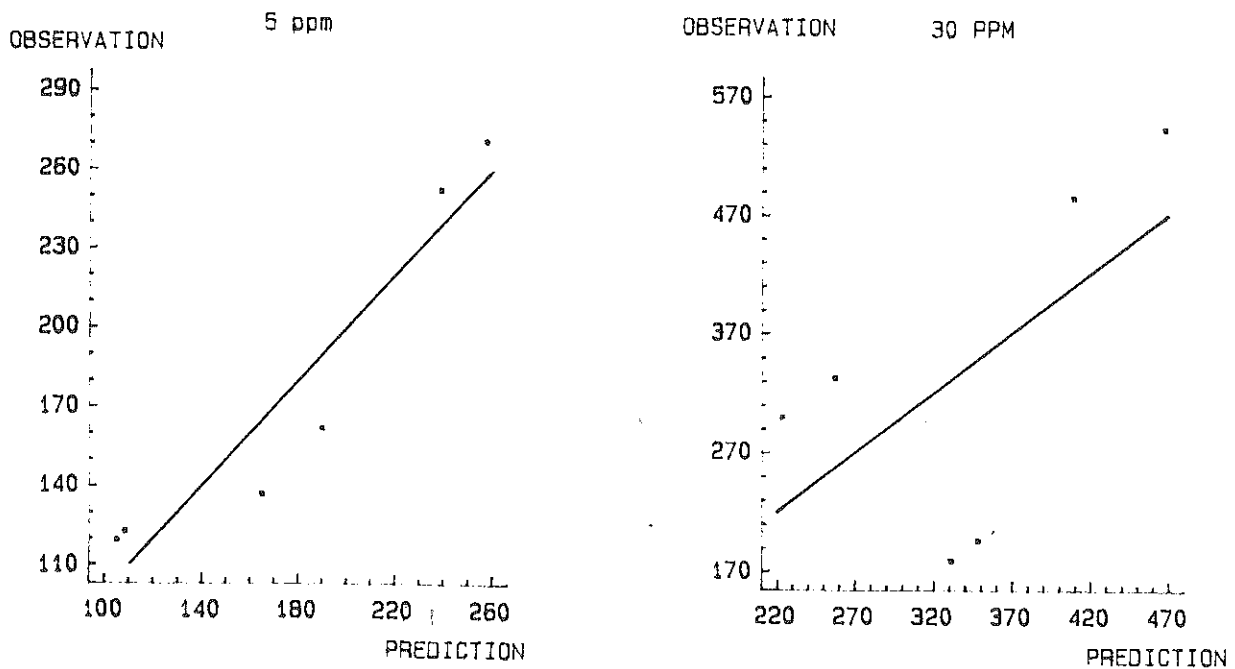
Globalement, la matrice est présentée par le tableau n°35 et le domaine expérimental du plan retenu est illustré par le tableau n°36. La valeur algébrique du point central correspond à la moyenne arithmétique ou logarithmique des valeurs hautes et basses retenues.

FACTEURS	MODALITES		
	niveau bas	point central	niveau haut
Concentration PDAO (mg/ml)	4	7	10
Concentration HRP (mg/ml)	0,02	0,2	2,0
Concentration LCV (mg/ml)	0,01	0,1	1
Température (°C)	30	--	37

**Tableau n° 36:** Domaine expérimental du PFF  $2^{4-1}$



**Figure n°26 :** Evolution de la coloration développée, en fonction du temps.



**Figure n°27 :** Résultats expérimentaux exprimés en fonction des résultats théoriques. Linéarité du modèle. Exemples à 5 et à 30 ppm.



Pour chaque série d'expériences, nous réalisons une gamme de six échantillons de concentration en histamine croissante : 2 – 5 – 10 – 30 – 60 et 100 ppm.

#### 4 – 5 – 3 – 3 – Résultats du plan factoriel fractionnaire

A l'aide d'un logiciel de traitement statistique des données (Statgraphics), un test de Fisher au seuil de 5 % est réalisé, à partir des résultats expérimentaux, obtenu après 30 minutes de cinétique, pour chaque point de la gamme d'histamine (annexe 11). Ce test détermine le niveau de signification des coefficients du modèle.

Ainsi, il apparaît nettement que le facteur LCV a un effet pur positif, quelle que soit la teneur en histamine de l'échantillon (P-value faible). Par contre, nous remarquons une variante quant à l'incidence des autres facteurs :

- aux faibles teneurs en histamine (2 à 5 ppm), HRP a un effet pur négatif,
- au delà de 10 ppm, PDAO a un effet pur positif.

Par contre, il s'avère que la température n'a pas d'incidence réelle, au vu de l'interprétation statistique. Toutefois, on observe que la coloration développée à 37°C est toujours supérieure à celle obtenue à 30°C. (figure n°25).

L'incidence du facteur "temps de la réaction", est déterminée par le test de Fisher, obtenu pour le plan factoriel fractionnaire sur trois facteurs (sans LCV), soit sur un plan  $2^{3-1}$ . Chaque point de la gamme est testé six fois, ce qui correspond à une lecture toutes les 5 minutes, sur 30 minutes (annexe 12). Nous remarquons ainsi, que l'effet statistiquement le plus significatif est obtenu après 30 minutes de cinétique. En effet, cette remarque est renforcée par la figure n°26, qui atteste de l'augmentation du développement de la coloration avec le temps.

Enfin, le logiciel Statgraphics nous fournit (figure n°27), la courbe exprimant la linéarité du modèle (résultats expérimentaux = F (résultats théoriques)). Cette illustration met en exergue, de façon indéniable, que la réponse du modèle étudié est non linéaire.

En conclusion, nous pouvons retenir que :

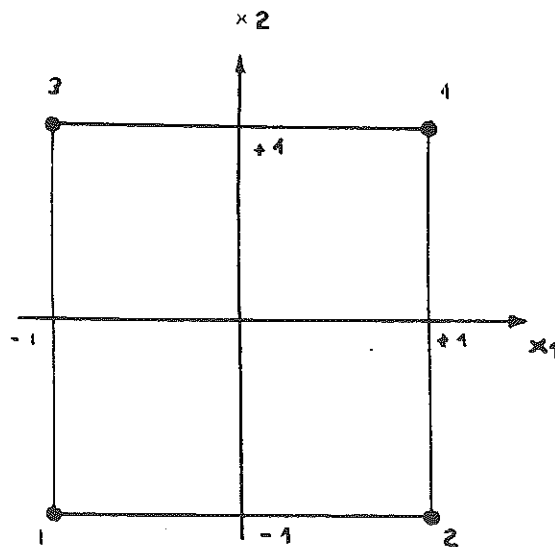
- Le facteur LCV, qui joue un rôle de précurseur de la coloration, doit être présent en excès, afin de ne pas fausser la visualisation de la réaction colorimétrique. Il est donc décidé d'en fixer la concentration au niveau haut, voire médian, du domaine expérimental.

- L'évolution variable des paramètres (PDAO et HRP), en fonction de la teneur en histamine de la solution dosée nous conduit à poser le prédicat suivant : "l'optimisation de ce dosage est à définir en fonction de la gamme d'histamine choisie (valeurs hautes ou basses), et les valeurs des paramètres retenues, ne sont pas extrapolables d'une extrémité à l'autre de la gamme". Au regard de la réglementation, nous retenons les valeurs basses de la gamme d'étalonnage (de 0 à 30 ppm).

- L'absence de linéarité du modèle nous impose un ajustement de ce dernier.

Expériences	PDAO	HRP
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

**Tableau n°37:** Matrice du PFC  $2^2$ , selon l'ordre de Yates.



**Figure n°28 :** Disposition des points expérimentaux d'un plan complet  $2^2$   
Formation d'un hypercube (D'après Goupy, 1990).

- La température de réaction est fixée à 37°C.

- La lecture des densités optiques sera toujours effectuée après 30 minutes de cinétique enzymatique, ce qui conserve ainsi, à la méthode son caractère rapide.

Fort de ces conclusions, nous décidons d'optimiser le modèle en réalisant un plan central composite.

#### 4 - 5 - 3 - 4 - Optimisation du modèle

Nous avons recours à un plan central composite qui correspond en fait à un plan factoriel complet combiné à un plan en étoile.

PCC = PFC + Plan étoile.

Le plan factoriel complet correspond à l'étude globale des effets purs des facteurs contrôlés, puisque toutes les combinaisons possibles des deux niveaux des facteurs sont testées. Il fait donc appel à deux fois plus d'expériences que le plan factoriel fractionnaire. C'est pourquoi, utilisé après allègement du nombre des paramètres influents, il implique la réalisation d'un nombre raisonnable d'expériences. De plus, il est très simple à réaliser et il fournit de nombreuses informations. Il s'agit donc d'un PFC  $2^k = 2^2$ , comprenant quatre séries d'analyses.

Ce plan expérimental est décrit à l'aide de la matrice des variables centrées réduites, selon l'ordre standard de Yates (Tableau n°37). Les niveaux haut et bas des facteurs redéfinis figurent sur le tableau n°38.

Niveaux Facteurs	Bas (-1)	Haut (+1)
PDAO (mg/ml)	1	10
HRP (mg/ml)	0,01	0,1

**Tableau n°38** Domaine expérimental du PFC  $2^2$ .

La figure n° 28, nous présente la disposition des points expérimentaux du plan complet  $2^2$ , qui forment une représentation géométrique appelée : hypercube.

Le plan en étoile offre lui, la possibilité d'étudier et de représenter les phénomènes qui ont des surfaces de réponse du deuxième degré, c'est-à-dire des surfaces qui présentent une courbure.

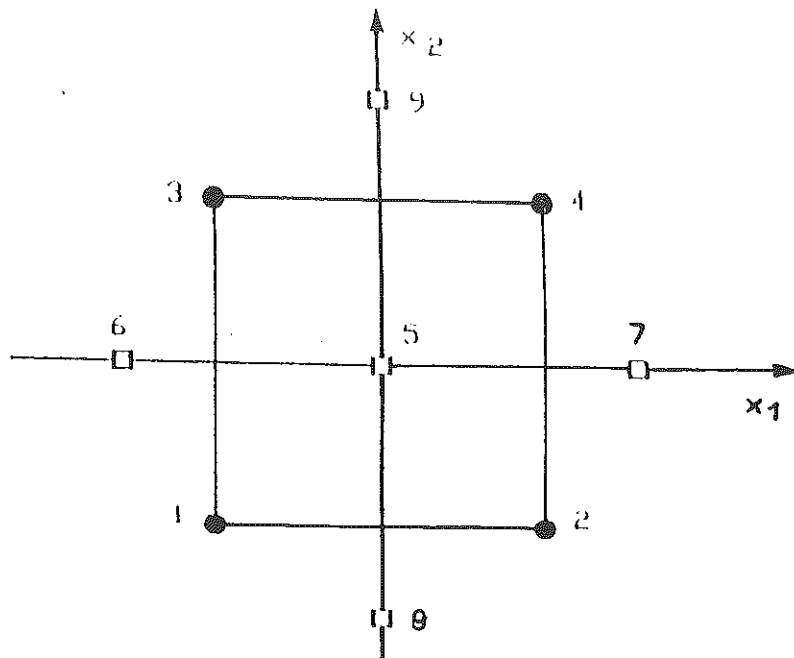


Figure n°29 : Disposition des points expérimentaux d'un plan complet  $2^2$  (cercles noirs) et des essais du plan en étoile associé (carrés blancs), (D'après Goupy, 1990).

Niveaux Facteurs	$-\alpha$ non codé	-1	0	+1	$+\alpha$ non codé
PDAO (mg/ml)	0,863	1,000	5,500	10,000	11,863
HRP (mg/ml)	$8,63 \cdot 10^{-3}$	0,010	0,055	0,100	0,118

Tableau n°40: Domaine expérimental du plan en étoile.

Essais	PDAO	HRP
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	$-\alpha$	0
9	$+\alpha$	0
10	0	$-\alpha$
11	0	$+\alpha$
12	0	0
13	0	0
14	0	0

Tableau n°41: Matrice complète des effets du PCC.

Le principe est d'aligner les points par trois, ce qui affecte au moins trois niveaux à chaque facteur. Ce procédé revient à construire une hypersphère (carrés blancs) inscrite dans l'hypercube défini par les points du plan factoriel complet (cercles noirs). Globalement, nous obtenons la forme géométrique représentée figure n°29.

Les abscisses maximum et minimum codées, de ces nouveaux points (carrés blancs), sur l'axe de chaque facteur, sont nommés  $\alpha$  et prennent cette même valeur pour tous.

Dans notre cas précis, le nombre de facteurs égal à deux, impose les caractéristiques suivantes :

\*  $\alpha = 1,414$

\* nombre d'essais égal à quatre.

La matrice d'expérience ainsi déterminée est représentée par le tableau n°39.

Facteurs \ Expériences	1	2
	PDAO	HRP
1	$-\alpha$	0
2	$+\alpha$	0
3	0	$-\alpha$
4	0	$+\alpha$

**Tableau n°39** Matrice d'expérience, induite par le plan en étoile du PFC 2<sup>2</sup>.

A partir de  $\alpha = 1.414$ , nous pouvons déterminer les valeurs numériques expérimentales, non codées prises respectivement par  $-\alpha$  non codé et  $+\alpha$  non codé, pour notre domaine expérimental précis. Le mode de calcul appliqué (annexe 13), nous permet d'obtenir le tableau n°40.

Nous étayons notre étude de points centraux, de coordonnées (0,0), situés au centre de l'hypersphère. Ils sont répétés un certain nombre de fois, en fonction du critère d'optimalité choisi. Ici, nous réalisons deux fois les points centraux triplés (Box and Draper, 1987).

#### 4 - 5 - 3 - 5 - Résultat du plan central composite

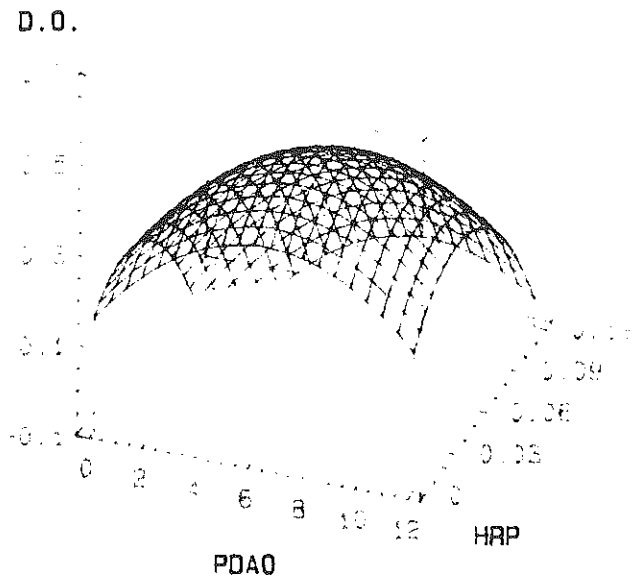
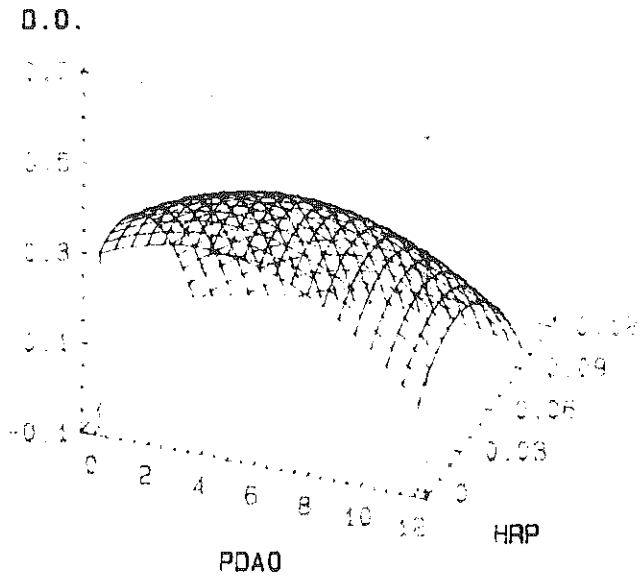
La matrice complète des effets du plan central composite est représentée tableau n°41.

L'ordre de réalisation des analyses a été tiré au sort et déterminé par le logiciel Statgraphics : il s'agit d'une randomisation.

Sur les résultats obtenus après 30 minutes de cinétique et pour chaque point de la gamme étalon (annexe 14), nous avons réalisé les tests suivants :

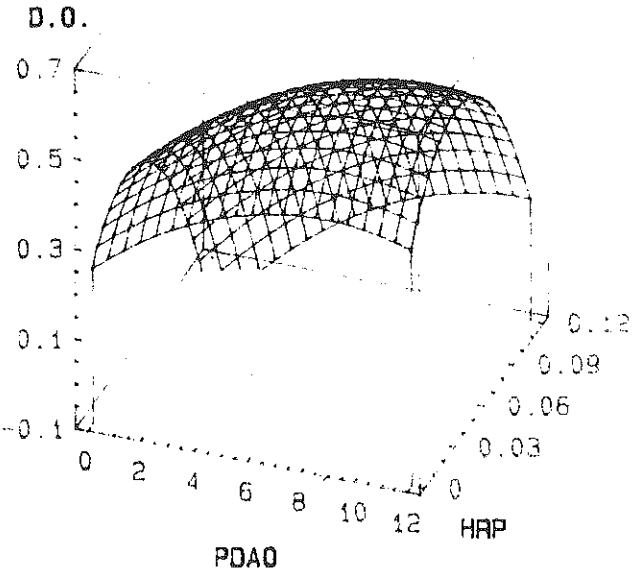
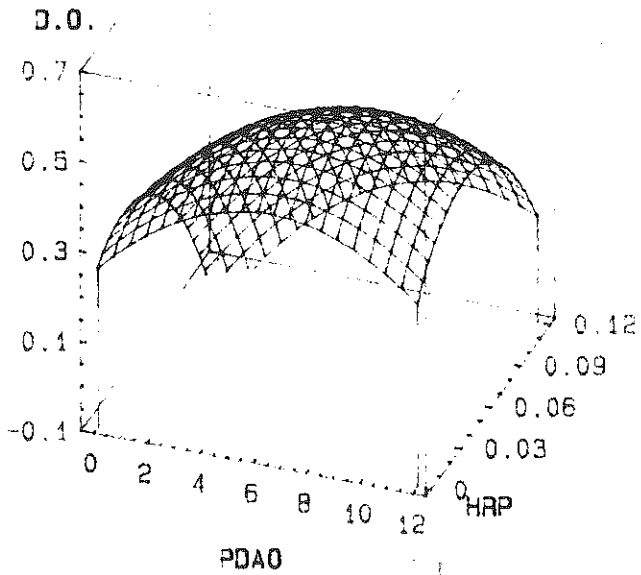
HISTAMINE 2 ppm

HISTAMINE 5 ppm



HISTAMINE 10 ppm

HISTAMINE 30 ppm



**Figure n°30** : Graphes des surfaces de réponses du PCC.

- Test de Fisher au seuil de 5 %, qui détermine la validité des coefficients : Estimation des effets (annexe 15) et Analyse de la variance (annexe 16).

- Détermination des surfaces de réponse et de leurs contours, à partir des équations des modèles obtenues grâce au calcul des coefficients de régression (annexe 17).

Nous pouvons ainsi décrire la variation des réponses en fonction des fluctuations des facteurs. L'objectif est de trouver la (ou les) combinaison(s) de facteurs conduisant à une optimisation de la réponse : Absorbance maximale pour un temps limité toutefois (inférieur à 30 min.).

Au regard de ces résultats, il apparaît plusieurs constatations :

- Le facteur HRP exerce un effet quadratique important sur la réponse, quelle que soit la teneur en histamine dosée : la valeur absolue de l'estimation des effets est très forte (annexe 15).

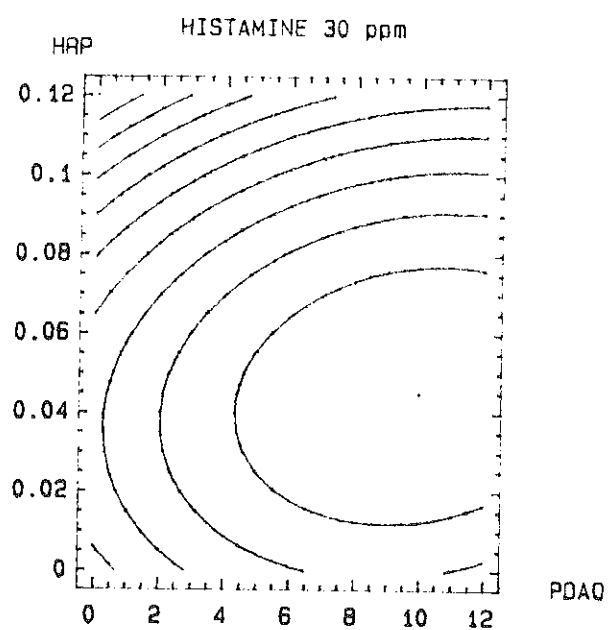
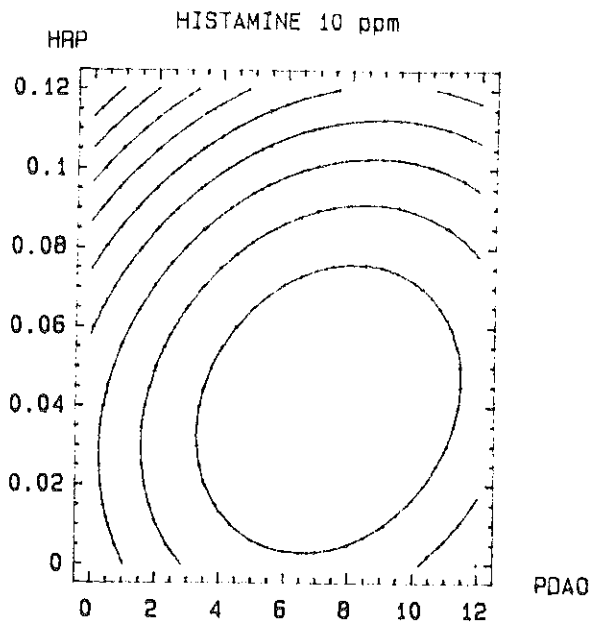
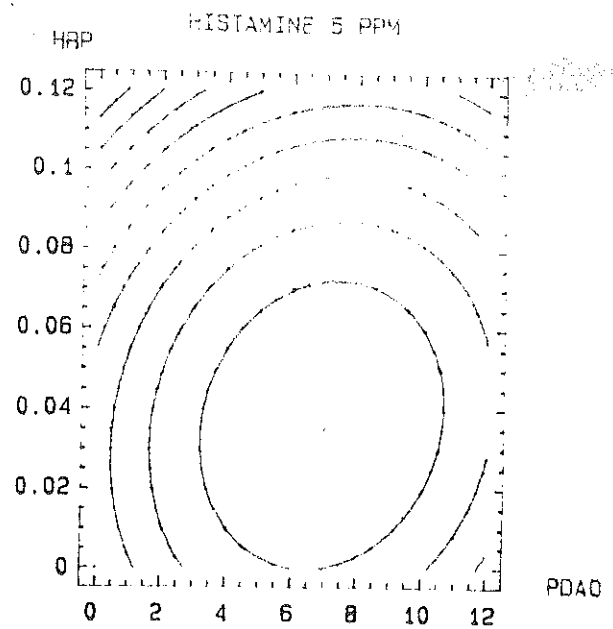
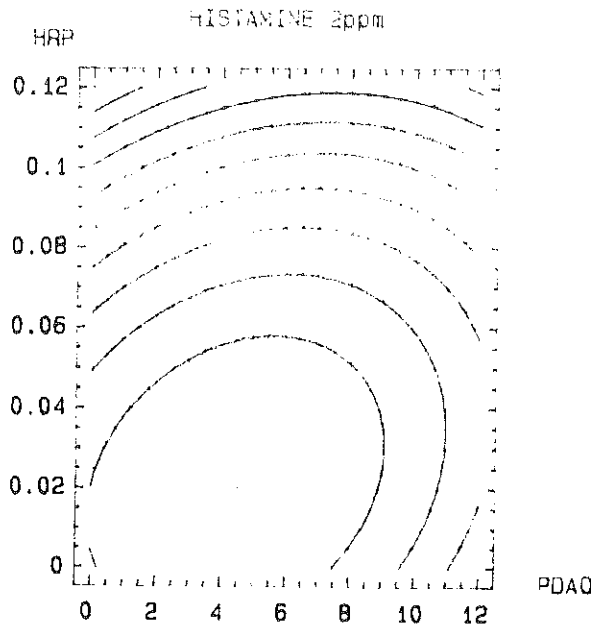
- L'effet quadratique de PDAO est par contre beaucoup plus faible (annexe 15).

- La peroxydase exerce un effet simple lorsque la concentration en histamine augmente (annexe 15).

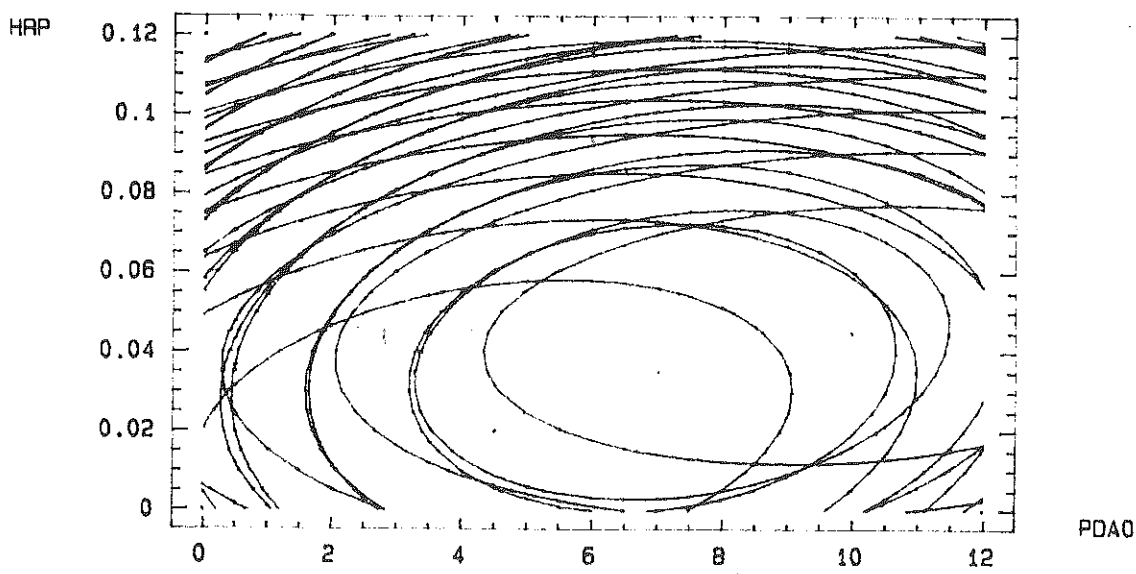
- Plus la concentration en histamine augmente et moins le modèle est bon. En effet, il apparaît un manque d'ajustement du modèle, traduit par l'augmentation de la valeur du "Lack-of-fit", lorsque la teneur en histamine augmente (annexe 16),

- Les représentations schématiques des surfaces de réponse en trois dimensions (Figure n°30) font apparaître très nettement l'évolution non linéaire du modèle. En effet, on remarque un maximum d'absorbance qui évolue en fonction de la teneur en histamine dosée. Les courbes des contours des surfaces de réponse en deux dimensions (Figure n°31), nous permettent de mieux visualiser et de mieux chiffrer ce déplacement : plus la teneur en histamine dosée est importante, plus les combinaisons de facteurs donnant la réponse optimale, prennent des valeurs hautes. Cette constatation vient renforcer et préciser l'hypothèse que nous avons formulée à l'issue du premier plan expérimental (PFF).

Enfin, nous sommes en mesure de déterminer une zone de concentrations optimales prises par chacun des facteurs, pour une gamme d'histamine déterminée (< 30 ppm). Pour ce faire, nous effectuons une superposition des quatre graphes des contours des surfaces de réponse, puis nous retenons les valeurs comprises dans cette union (Figure n°32).



**Figure n°31** : Graphes des contours des surfaces de réponses du PCC.



**Figure n°32** : Superposition des graphes des contours des surfaces de réponses du PCC.



Le domaine expérimental ainsi déterminé et retenu, est présenté sur le tableau n°42, pour une gamme d'histamine inférieure à 30 ppm. Si un premier dosage rapide laisse apparaître une teneur en histamine supérieure à 30 ppm, il est impératif d'envisager une dilution, ramenant cette teneur dans la gamme préconisée.

Facteurs	Valeurs
PDAO	6,00 mg/ml
HRP	0,03 mg/ml
LCV	1,00 mg/ml
Température	37 °C
Temps	30 min.

**Tableau n°42:** Domaine expérimental retenu après optimisation du dosage.

#### 4 - 5 - 4 - Conclusion

Si la détermination des paramètres expérimentaux nous était apparue très délicate à mettre en place et à réaliser de façon classique, nous pouvons affirmer avec enthousiasme, au terme de cette étude, que la méthodologie des plans expérimentaux nous a permis d'ajuster au mieux et de concevoir l'évolution de ce modèle expérimental.

Ainsi, ne pouvant approfondir les mécanismes de la réaction enzymatique, qui représentent le fondement de cette manipulation, nous avons pu, par une approche différente, en comprendre l'évolution, qui s'est révélée non linéaire.

En effet, il apparaît que le LCV doit être incorporé en excès et que les autres enzymes doivent être présentes en quantité suffisante et raisonnable, par rapport au substrat histamine, afin de permettre le développement quantitatif de la réaction :

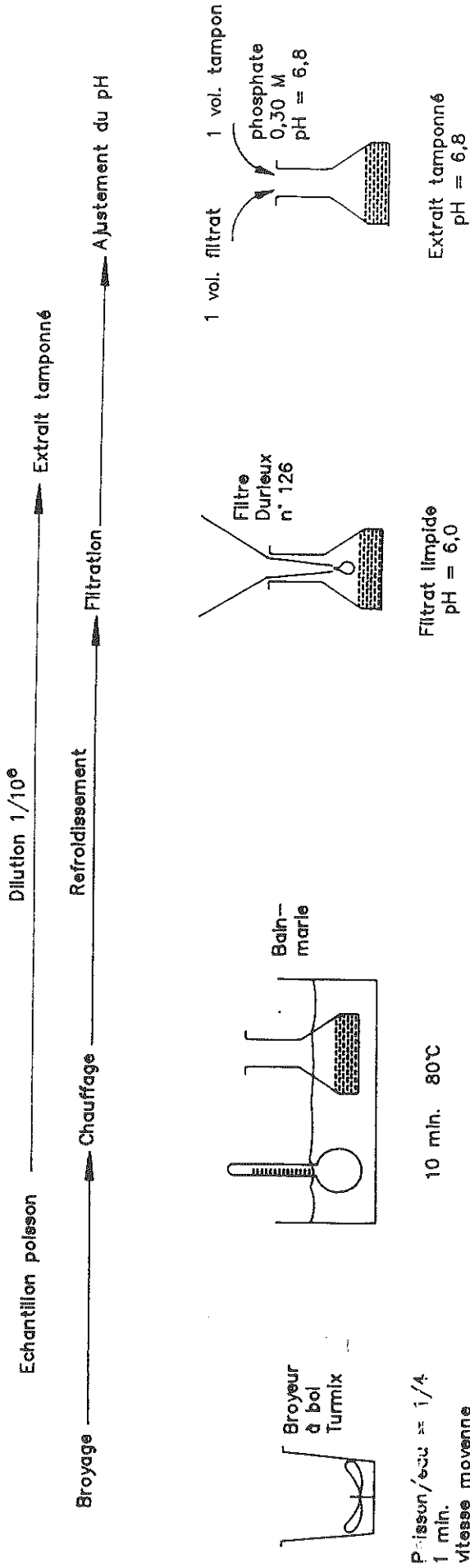
- en trop forte concentration, elles ne donnent pas une réponse optimale et augmentent, de plus, le coût du dosage.

- en trop faible quantité, elles se trouvent présentes par défaut, faussant ainsi les résultats obtenus. En effet, le substrat histamine se trouve en excès par rapport à l'enzyme qui est alors limitante et qui, par réaction en chaîne, limite la deuxième réaction. Le développement de la coloration est ainsi proportionnellement amoindri.

Enfin, il est important de bien avoir à l'esprit que ce protocole n'est ajusté que pour une gamme de concentration en histamine déterminée et qu'une extrapolation hors de cette gamme, nécessiterait une nouvelle démarche d'optimisation.

**TROISIEME PARTIE**  
**RESULTATS - DISCUSSION**

# EXTRACTION



# DOSAGE

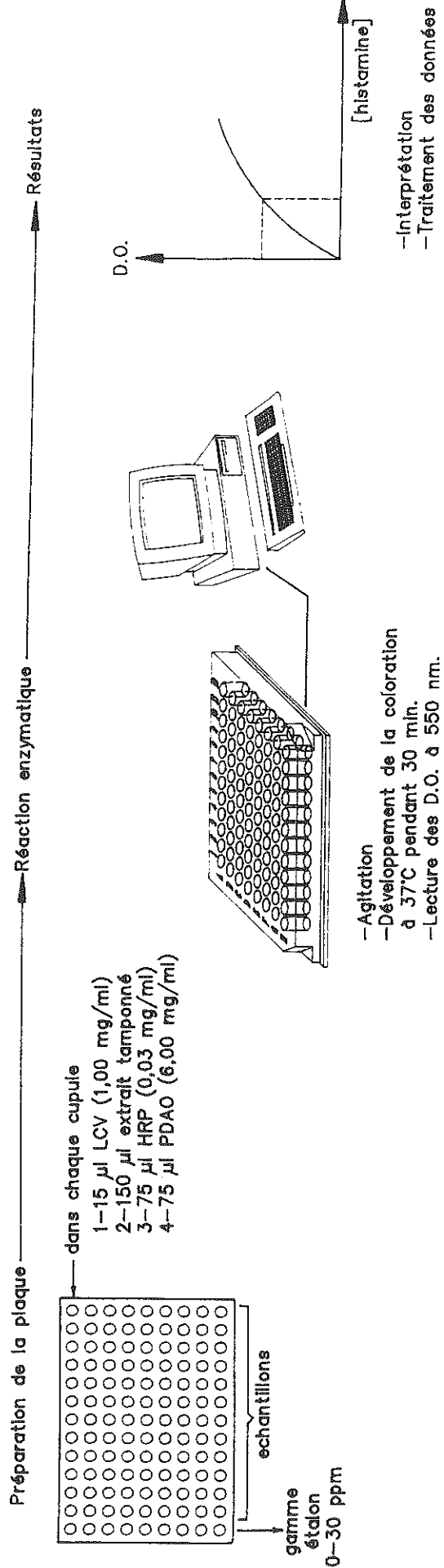


Figure n°33: DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'HISTAMINE

## **TROISIEME PARTIE - RESULTATS - DISCUSSION**

### **I - METHODE RETENUE**

L'optimisation de ce dosage a porté sur trois points principaux :

- l'extraction de l'histamine,
- la réalisation d'une gamme d'étalonnage représentative,
- la détermination optimale des paramètres du dosage.

Elle nous a permis de retenir le protocole présenté schématiquement par la figure n° 33 et applicable pour des échantillons de thon, contenant de 0 à 300 ppm d'histamine (soit 0 à 30 ppm d'histamine dans l'extrait).

Avant de l'adopter sans appel, il est indispensable d'en déterminer les critères de fiabilité et de la valider.

### **II - VALIDATION : COMPARAISON A LA CLHP**

La validation d'une technique de dosage à caractère nouveau, est envisageable par comparaison à un autre dosage dont l'exactitude a été préalablement approuvée et retenue, ainsi considérée comme technique de référence. Pour ce faire, nous avons recours à une méthode de dosage de l'histamine et des autres amines biogènes, par Chromatographie Liquide Haute Performance en dérivation post-colonne à l'OPT (Ritchie and Mackie, 1989). Nous suivons les conditions d'extraction aqueuse retenues, pour le traitement de l'échantillon et de la gamme d'étalonnage, contrairement au protocole de Ritchie, qui préconise une extraction au TCA. Une série de trente cinq échantillons est ainsi dosée.

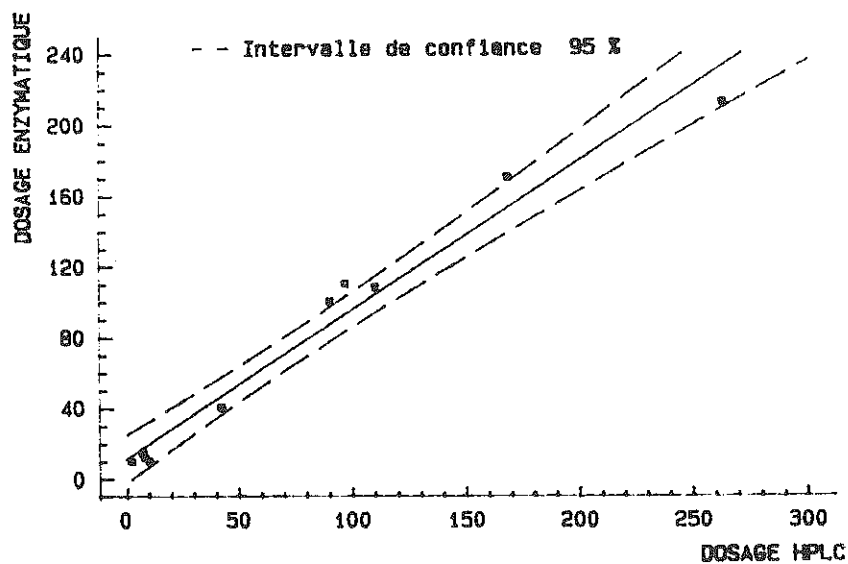
Les résultats présentés par le tableau n°43 sont satisfaisants, hormis un échantillon putride riche en cadavérine (670 ppm), présentant une valeur déterminée par CLHP, très supérieure.

De plus, la droite de régression (figure n°34), représentant l'expression des données enzymo-colorimétriques, en fonction des données CLHP, laisse apparaître une bonne corrélation entre ces deux méthodes (coefficient de corrélation = 0,985).

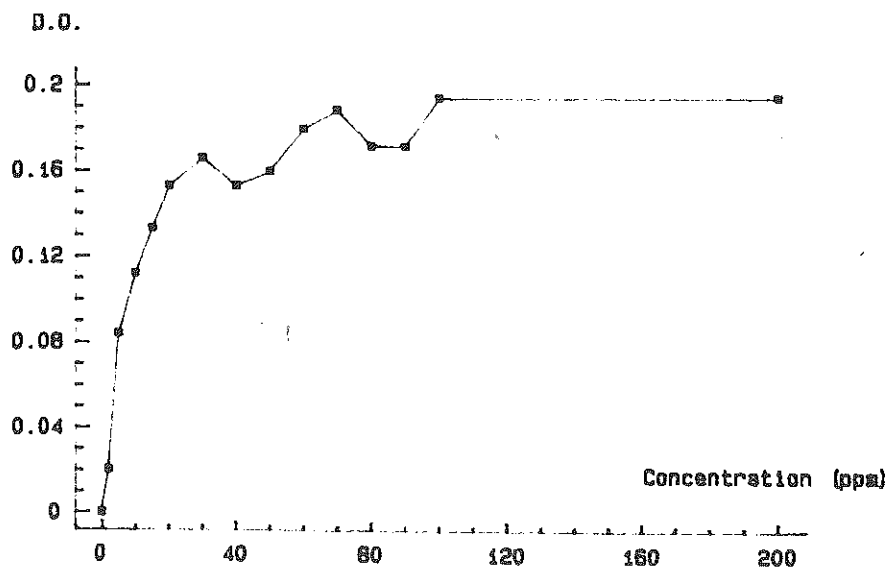
Toutefois, avant de nous avancer hâtivement quant à l'exactitude de cette méthode, nous souhaitons en déterminer les critères de fiabilité ainsi que les éventuelles interférences.

Analyse CLHP (ppm)	Analyse enzymo-colorimétrique
2120 (*)	> 300
263	212
168	170
110	108
97	110
90	100
42	40
19	< 10
10	10
8	12
7	15
6	< 10
Série de 11 échantillons à 5 - 2 et 0 ppm	< 10

**Tableau n°43** : Etude comparative des méthodes CLHP et enzymatique  
 (\*) échantillon contenant 670 ppm de cadavérine.



**Figure n°34** : Etude comparative des méthodes Enzymatique et CLHP.



**Figure n°35** : Dosage de l'histamine dans un extrait de thon - Gamme étalon.

### III - CRITERES DE FIABILITE

Les données traitées statistiquement ont mis l'accent sur la limite de linéarité de ce modèle et par conséquent, sur la réduction du domaine de validation de la méthode (de 0 à 300 ppm d'histamine dans le poisson).

Or, dans l'optique d'une utilisation industrielle, en contrôles courants, il est difficile de préjuger de la contamination histaminique des échantillons. Il s'avère donc indispensable d'étendre l'étude à des extraits plus chargés en histamine.

#### 1 - Domaine d'application

L'élargissement de la gamme d'étalonnage est orienté en fonction de la qualité organoleptique du thon. En effet, il ne nous semble pas judicieux de tester des échantillons étalons renfermant une dose d'histamine correspondant à un poisson jugé non acceptable, ou encore putréfié. La teneur maximale retenue est donc de 200 ppm dans l'extrait, soit 2000 ppm dans le poisson.

La figure n° 35 montre que de 0 à 30 ppm, la coloration développée est croissante et qu'au delà, elle oscille et progresse légèrement.

Ces résultats viennent corroborer les conclusions retenues lors de la détermination du domaine expérimental par la méthodologie des plans d'expériences. Nous renforçons donc notre propos, conseillant d'effectuer une dilution en présence d'échantillons très chargés en histamine, afin de conserver au dosage, sa précision.

#### 2 - Limite de détection

La limite de détection représente la quantité minimale de constituant susceptible d'être mesurée de façon fiable. Ce seuil est déterminé à partir d'essais à blanc (thon exempt d'histamine), selon Dreux et Métails (1978), par la formule suivante :

$$X = \bar{X} + 3 \sigma.$$

$\bar{X}$  = moyenne des D.O. des 32 essais  
 $\sigma$  = écart type des D.O. des 32 essais

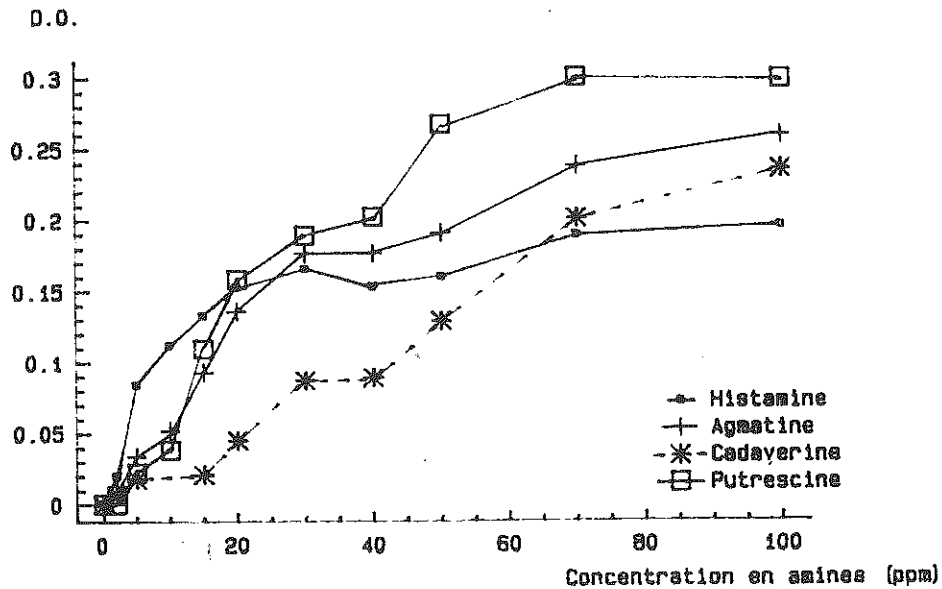
Or, selon notre protocole expérimental, l'expression de la limite de détection se trouve réduite à  $3 \sigma$ , puisque les blancs sont systématiquement défalqués des valeurs de densités optiques.

A partir de trente deux mesures, la limite de détection, exprimée en densité optique est de 0.033, ce qui correspond à une concentration en histamine inférieure à 10 ppm dans le poisson.

Molécules testées	Réaction (*)
Agmatine	+
Cadavérine	+
Carnosine	-
Citrulline	-
Créatinine	-
Ethanolamine	-
Guanidine	-
Ornithine	-
Putrescine	+
Spermidine	-
Spermine	-
Triéthylamine	-
Triméthylamine	-
Tryptamine	-
Tyramine	-

(\*) : Développement de coloration = +  
Absence de coloration : -

**Tableau n°44** : Réactivité des Amines biogènes et dérivés, à la PDAO.



**Figure n°36** : Etude des interférences de l'agmatine, la putrescine et la cadavérine, sur le dosage enzymatique de l'histamine.

### 3 – Spécificité et Sélectivité

L'étude de ces deux notions nous conduit à expérimenter d'autres amines biogènes afin d'apprécier les éventuelles interférences que certaines peuvent avoir sur ce dosage enzymatique. Avant tout, il convient d'énoncer clairement ce qui est entendu par ces deux définitions :

– Méthode spécifique : elle ne fournit un signal que pour le seul élément à mesurer, dans un système pluriconstituants.

– Méthode sélective : elle procure un signal pour certains éléments à l'exclusion des autres, dans un système comportant de nombreux constituants.

Un groupe de seize amines biogènes et dérivés, en solution à 100 ppm, est testé, afin d'évaluer la réactivité de ces molécules dans les conditions expérimentales. Les réponses obtenues (tableau n°44) montrent que seules trois amines réagissent positivement à ce système enzymatique : l'agmatine, la putrescine et la cadavérine.

Une étude plus approfondie de ces trois amines, réalisée sur des gammes d'étalonnage variant de 0 à 100 ppm, laisse apparaître (figure n°36), que la cadavérine est nettement moins réactive que l'histamine, en dessous de 60 ppm dans l'extrait, soit 600 ppm dans le thon. L'agmatine et la putrescine réagissent moins que l'histamine aux faibles concentrations (inférieures à 10 ppm), de façon quasi similaire pour des valeurs intermédiaires (de 20 à 40 ppm) et beaucoup plus au delà de 40 ppm dans l'extrait, soit 400 ppm dans le thon.

Toutefois, ces interférences ne sont significatives que pour des densités optiques développées, supérieures à 0.02, correspondantes à des concentrations de 40 ppm d'agmatine, ou de 50 ppm de putrescine ou de cadavérine dans le thon.

Or, une étude menée parallèlement, au sein de l'Ifremer, par Darzacq (1992), montre que ces concentrations en amines ne sont rencontrées que dans du thon en état d'altération avancée.

En conclusion, nous pouvons affirmer que ce système enzymatique ne présente, certes pas une spécificité stricte par rapport à l'histamine, mais qu'il est par contre sélectif pour quatre amines : l'histamine, l'agmatine, la putrescine et la cadavérine. Nous pouvons donc considérer, que dans un contexte industriel; où les dosages sont réalisés sur des produits apparemment satisfaisants (aspect, couleur, odeur, texture), jugés acceptables d'un point de vue organoleptique; l'absence de spécificité ne peut pas fausser ou perturber de façon notable une analyse de thon, par la présence des trois autres amines.



Charge histaminique théorique (ppm)	2	5	10	20
Moyenne (ppm)	2,07	5,04	9,60	20,75
Ecart type ( $\sigma$ )	0,28	0,61	2,68	5,78
Coef. de variation (%)	13,5	12,1	27,9	27,8

**Tableau n°45** : Expression de la répétabilité sur 24 échantillons.

Charge histaminique théorique (ppm)	2	5	10	20
Nombre d'échantillons	21	19	21	11
Moyenne ( $\bar{x}$ ppm)	2,16	5,25	10,7	20,8
Ecart type ( $\sigma$ )	0,39	0,94	2,17	5,80
Coef. de variation (%)	18,0	17,9	20,3	27,8
t de Student à 95%	2,080	2,093	2,080	2,201
$\bar{x} \pm t \sigma$ (ppm)	2,16 $\pm$ 0,81 1,35 / 2,97	5,25 $\pm$ 1,97 3,28 / 7,22	10,7 $\pm$ 4,51 6,19 / 15,21	20,8 $\pm$ 12,76 8,01 / 33,56

**Tableau n°46** : Test de reproductibilité intersérielle intralaboratoire.

#### 4 - Précision

En fonction des conditions opératoires retenues par l'expérimentateur, la précision d'un dosage est exprimée par la répétabilité ou par la reproductibilité.

##### 4 - 1 - Répétabilité

La répétabilité est déterminée en réunissant les conditions expérimentales optimales : même opérateur, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils, les mêmes réactifs, sur la même série d'analyse et le même spécimen.

Les essais de répétabilité, réalisés sur une série de vingt quatre déterminations sont résumés sur le tableau n°45. Les coefficients de variation obtenus évoluent de 12 à 28%, avec les concentrations histaminiques des points de la gamme étalon, corroborant ainsi l'absence de linéarité présentée par la réaction.

##### 4 - 2 - Reproductibilité

L'évaluation de la précision est ici réalisée sur plusieurs jours, sur des séries d'analyses, des réactifs et des étalons différents, mais par le même opérateur, dans le même laboratoire et avec les mêmes appareils toutefois. Il s'agit donc de l'expression de la reproductibilité intersérielle, intralaboratoire.

Les résultats déterminés à partir d'une vingtaine de mesures (tableau n°46) progressent de 18 à 28 %, en fonction des points de la gamme également, confirmant une fois de plus le caractère non linéaire de la réaction enzymatique.

Au regard de ces différentes valeurs, il apparaît que les coefficients de variation déterminés dans les conditions d'expression les meilleures (répétabilité), sont très légèrement inférieurs à ceux calculés lorsque les conditions d'expression sont plus défavorables (reproductibilité).

Le faible écart présenté par ces deux expressions de la précision s'explique par la nature de l'erreur expérimentale commise :

- l'erreur de pipettage, qui n'entre pas en considération lorsque les analyses sont réalisées par le même opérateur, sur le même appareil et dans le même laboratoire.

- l'erreur de préparation des réactifs et des solutions (étalons et essais), qui est non significative au seuil de 5 %.

Quant à l'augmentation des valeurs prises par les coefficients de variation, en fonction de l'augmentation des concentrations en histamine des points de la gamme, nous l'expliquons par l'expression non linéaire de la réponse. En effet, la courbe représentant l'évolution de la densité optique en fonction de la concentration en histamine, présente pour chaque section reliant deux points, une pente différente et dégressive (pente qui s'éloigne de un), réduisant ainsi la précision de la courbe de calibration.

## 5 - Sensibilité

L'expression de la sensibilité permet de juger la qualité de la méthode ainsi que celle de l'instrument de mesure. En règle générale, elle est fournie par la pente des droites de régression de la courbe d'étalonnage. Dans le cas particulier de notre étude, l'absence de linéarité observée, nous conduit à envisager le calcul de la sensibilité pour plusieurs domaines d'application. En effet, à partir de la droite d'étalonnage (figure n°35), établie à l'aide de seize essais, trois pentes sont déterminées :

- de 0 à 10 ppm                                      pente = 0,011 unité de D.O. / ppm.
- de 10 à 20 ppm                                    pente = 0,004 unité de D.O. / ppm.
- de 20 à 100 ppm                                 pente = 0,0005 unité de D.O. / ppm.

On remarque que la sensibilité décroît lorsque la concentration histaminique augmente, prouvant bien que la méthode est plus sensible pour des faibles charges en histamine. Pour le domaine d'application variant de 0 à 10 ppm, elle apparaît statistiquement significative au seuil de 5 %, pour un ppm, alors que pour la zone de concentration allant de 10 à 20 ppm, elle est statistiquement significative au seuil de 5 %, pour deux ppm. Néanmoins, il est important de tenir compte de la limite de détection du dosage, qui est de l'ordre de 10 ppm, par conséquent, nous retiendrons plutôt l'expression de la sensibilité correspondant au domaine expérimental compris entre 10 et 20 ppm, soit 0,004 unité de DO/ppm.

## 6 - Conclusion

Cette étude statistique portant sur la fiabilité de la méthode nous permet d'avancer que :

- Ce procédé enzymatique de dosage de l'histamine a prouvé son exactitude par rapport à la méthode de référence qu'est la chromatographie liquide haute performance.
- Le domaine d'application relativement vaste, suscite toutefois le recours à une dilution, pour les échantillons chargés à plus de 200 ppm en histamine, afin d'en évaluer précisément la contamination.
- La limite inférieure de détection est de 10 ppm dans le poisson.
- L'absence de spécificité stricte et la sélectivité élargie n'engendre pas d'interférence gênante, pour du thon organoleptiquement acceptable.
- La précision est satisfaisante en utilisation industrielle de contrôle de la matière première, à condition de respecter les valeurs du domaine d'application.
- La sensibilité de 0,004 unité de D.O. / ppm est considérée statistiquement significative, à 2 ppm près, au seuil de 5 %.

INVESTISSEMENTS	COÛT (F)	COÛT (ECU)
Lecteur de plaque	30 000	-----
Balance de précision	15 000	-----
Balance trébuchet	10 000	-----
Broyeur type Turmix	2 850	-----
pH mètre	4 000	-----
Bain marie Thermoplongeur	5 300	-----
Pipette multicanaux :		
petit volume	3 000	-----
grand volume	3 000	-----
<b>TOTAL HT</b>	<b>73 150</b>	<b>10 450</b>
<b>TOTAL TTC</b>	<b>86 756</b>	<b>12 395</b>

**Tableau n°47** : Etude financière (Sept. 1992) – Investissements.

Réactifs	Prix	Concentration	Quantité	Coût TTC
PDAO	153 F/1 g	6 mg/ml	10 ml : 60 mg	9,2 F
HRP	174 F/10 mg	0,03 mg/ml	3 ml : 0,09 mg	1,6 F
LCV	118,5 F/5 g	1 mg/ml	10 ml : 10 mg	0,3 F
Hista. dihydro.	220 F/10 g	100 ppm	25 ml : 4,2 mg	0,1 F
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	84 F/250 g	0,3 mole/l	25 ml : 1 g	0,4 F
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	68,5 F/100 g	0,3 mole/l	25 ml : 1,5 g	1,1 F
<b>Total réactifs</b>				<b>12,7 F</b>
Petit matériel	Prix	Quantité		Coût TTC
Pointes jetables	150 F/128	96 + 8 + 8		131,3 F
Plaques	433 F/50	1		8,7 F
<b>Total petit matériel</b>				<b>140,0 F</b>
<b>TOTAL GLOBAL</b>				<b>152,7 F</b>

**Tableau n°48** : Etude financière (Sept. 1992)  
Consommables pour une plaque (44 analyses en double).

#### IV - PRATICABILITE

Sous le terme de "praticabilité", on entend présenter les aspects généraux de ce dosage, permettant d'éclairer l'utilisateur sur la mise en oeuvre de la méthode et les problèmes pratiques soulevés par sa réalisation :

- Durée d'exécution : à l'échelle industrielle, dans un laboratoire de contrôle, trente échantillons peuvent être dosés en huit heures : broyage, extraction, dosage et réalisation simultanée de la gamme d'étalonnage.

- Tours de main : dans le contexte actuel de réalisation des manipulations, l'expérimentateur doit être capable de maîtriser les pesées au milligramme près, les opérations de dilutions, l'utilisation de pipettes automatiques mono ou multicanaux. Cette notion sera très largement redéfinie dans le cadre d'un élargissement de la méthode (paragraphe VI).

- Appareillage : selon la précision du dosage recherchée et la présentation des réactifs commercialisés (kit, pastille, poudre, solution), nous considérons que l'équipement nécessaire et suffisant à la réalisation de ce dosage doit comporter le matériel suivant :

- \* balance de précision,
- \* balance analytique,
- \* broyeur à bol,
- \* bain-marie,
- \* instrument de lecture type spectrophotomètre,
- \* pipettes.

- Difficultés rencontrées : elles se résument à l'instabilité des solutions enzymatiques dans le temps d'une part, et à la difficulté d'obtention d'extrait limpide d'autre part.

Présentée ainsi, nous retiendrons que cette méthode de dosage ne peut être exécutée que dans un laboratoire comportant le minimum d'équipements décrits ci-dessus.

#### V - ETUDE ECONOMIQUE

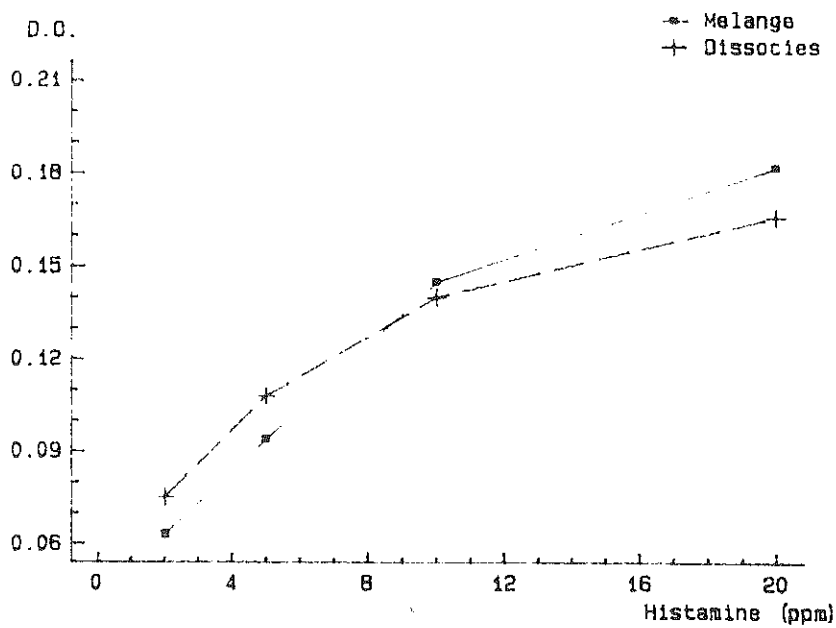
Cette étude a pour objectif la présentation du coût de l'investissement nécessaire à la mise en place, en laboratoire, de ce dosage (tableau n°47), ainsi que son coût de revient en consommables (tableau n°48).

Sachant qu'une plaque de microtitration contient quatre vingt seize puits et que le blanc et les standards occupent huit puits, alors quatre vingt huit puits restent disponibles afin de doser quarante quatre échantillons en double :

1 plaque = 96 puits -> 8 puits (blancs + standards)  
-> 88 -> 44 essais en double.

Nombre d'essais réalisés / jour	Coût TTC	
	Francs	ECU
44	3,50	0,50
30	3,70	0,53

**Tableau n°49** : Coût de fonctionnement d'une analyse réalisée en double. (réactif + petit matériel)



**Figure n°37** : Etude comparative des utilisations de réactifs en mélange et individuellement.

Nous pouvons donc exprimer le coût de fonctionnement d'un essai réalisé en double à l'aide du tableau n°49. Il est dégressif en fonction du nombre total d'analyses réalisées simultanément et de l'ordre de 0,37 F / analyse, lorsqu'un technicien en réalise trente par jour, pour un investissement en équipement de 73 000 F.

Considérant qu'un dosage de l'histamine par CLHP est facturé environ 350 F/analyse et malgré l'absence d'intégration du coût de personnel dans l'étude enzymatique, il apparaît une très nette différence économique entre ces deux types de dosages.

Au regard de ces conclusions analytiques et économiques relativement encourageantes et pour accentuer plus encore notre démarche de simplification, nous avons recherché à élargir davantage notre approche expérimentale.

## **VI - EXTENSION DE LA METHODE**

L'objectif poursuivi par cette démarche d'élargissement du protocole optimisé, vise à proposer aux industriels de la transformation du thon, une méthode de dosage de l'histamine encore plus accessible, plus aisée, plus rapide et moins coûteuse.

Plusieurs orientations sont envisagées, portant d'une part sur les réactifs et d'autre part sur l'appareillage requis.

### **1 - Présentation et utilisation des réactifs**

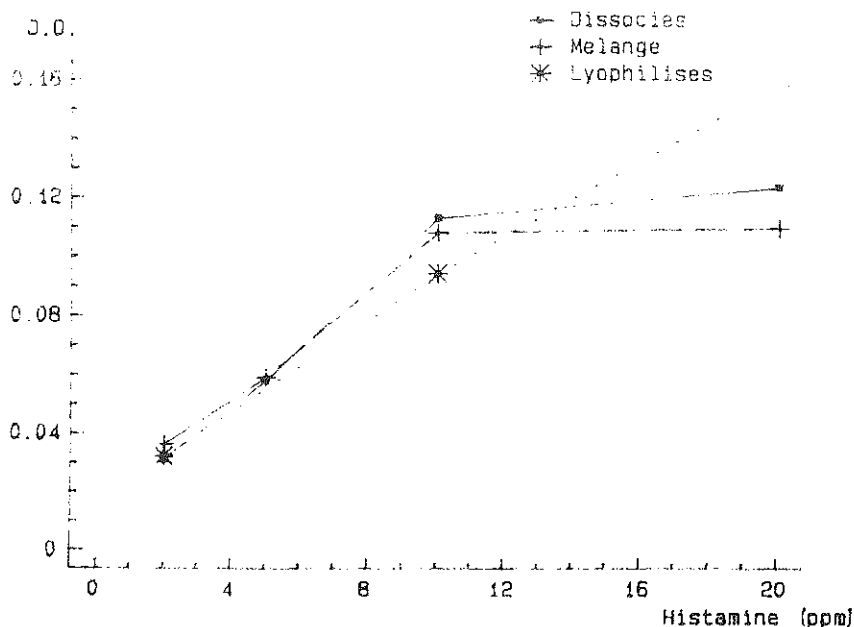
#### **1 - 1 - Mélange des réactifs**

Afin de réduire l'erreur expérimentale et de limiter les manipulations délicates, les deux enzymes qui interviennent dans la réaction sont réunies volume à volume, en une seule solution, ce qui augmente le volume distribué. Nous diminuons ainsi le nombre de manipulations.

La figure n° 37, qui nous présente les réponses obtenues pour les réactifs en mélange et dissociés, ne laisse pas apparaître de différence significative au seuil de 5 % (annexe 18). Toutefois, le coefficient de corrélation est légèrement meilleur en mélange de réactifs, avec 0,966 contre 0,950 en utilisation dissociée des réactifs. Il semble donc souhaitable de mélanger ces deux enzymes en une seule solution, avant la réaction enzymatique proprement dite.

#### **1 - 2 - Lyophilisation des réactifs**

Les réactifs enzymatiques doivent être préparés quotidiennement, par conséquent, afin de lever cette contrainte, et dans un souci de simplification extrême de la manipulation, une forme deshydratée des réactifs ne nécessitant qu'une simple mise en solution des réactifs nous semble intéressante.



**Figure n°38** : Incidence de la lyophilisation des enzymes, sur la réaction enzymo-colorimétrique.

# Sigma Immuno Chemicals

## SIGMA FAST™ COMPRIMÉS DE SUBSTRAT ENZYMATIQUE

Voici donc des substrats prêts à être utilisés évitant le travail de préparation.

Sigma Immunochemicals, le leader mondial pour les comprimés de substrat enzymatique, permet de transformer la préparation de substrats enzymatiques en une opération très simple. Pas de tampon à préparer, ni de pH à ajuster, pas de poudre dangereuse à peser et pas de peroxyde d'hydrogène à manipuler.

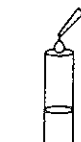
Les comprimés de substrat enzymatique SIGMA FAST™ sont spécialement apprêtés afin d'obtenir une concentration de tampon optimale pour une grande variété de conditions opératoires. Les substrats peroxydase contiennent un substitut d' $H_2O_2$  sous forme de comprimé. Que vous ayez besoin de substrats pour l'immunoblotting, l'immunohistologie, ou l'ELISA, les comprimés de substrat enzymatique SIGMA FAST™ sont disponibles.

1, 2, 3... Vos substrats sont prêts !

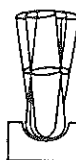
Trois Etapes Faciles  
pour des Substrats Enzymatiques Très Performants :



**1**  
Ouvrir l'emballage et mettre le(s) comprimé(s) dans un tube.



**2**  
Ajouter la quantité requise d'eau distillée ou désionisée.



**3**  
Agiter jusqu'à dissolution ; le substrat est prêt à l'emploi.

SIGMA CHEMIE — L'Isle d'Abeau - Chesnes • B.P. 701 - 38297 SAINT-QUENTIN-FALLAVIER  
Tél: 74.82.28.00 - Numéro Vert: 05.21.14.08 - Télécopie: 74.95.68.08

**Figure n°39** : Plaquette publicitaire Sigma : réactifs en comprimés.



Les deux enzymes sont donc mélangées volume à volume puis déshydratées par lyophilisation à froid. Au moment de l'emploi, une simple réhydratation des réactifs permet d'alléger la préparation de la manipulation.

Comparée au dosage dit "classique" (figure n°38), la courbe obtenue à partir des réactifs lyophilisés apparaît très linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,998 contre une valeur de 0,901 pour le dosage classique.

Au regard de ces chiffres très parlant, nous sommes tentés d'affirmer que la lyophilisation fournit des résultats très satisfaisants. Néanmoins, il serait plus prudent de confirmer ces observations après un stockage prolongé en congélation, des réactifs sous forme lyophilisée.

En conclusion, ces observations nous permettent d'avancer que le mélange des deux enzymes et leur lyophilisation est envisageable. Sans modifier les performances du dosage, une telle présentation des réactifs enzymatique permettrait :

- Un gain de temps de préparation des réactifs.
- Une bonne conservation des réactifs et un stockage sous forme "prêt à l'emploi".
- Une répartition des réactifs permettant d'effectuer un nombre déterminé d'analyses, ce qui éviterait des surcoûts engendrés par la péremption des réactifs.

### 1 - 3 - Nouveautés

Pour répondre à la proposition de présentation simplifiée des réactifs, une nouvelle forme de commercialisation des réactifs enzymatiques vient de sortir sur le marché. Les laboratoires Sigma proposent des comprimés, qu'une simple mise en solution transforme en une solution dosée et tamponnée, prête à l'emploi, comme l'indique la plaquette publicitaire (figure n°39). Proposé aujourd'hui pour des substrats enzymatiques spécifiques de peroxydases par exemple, cette formule offre de nombreuses perspectives quant aux possibilités d'allègement des préparations de réactifs. Une telle présentation limiterait ainsi :

- Le temps et la complexité de préparation des réactifs.
- L'équipement en balances ou en pHmètre.
- Le recours à une main d'oeuvre qualifiée.

De plus, elle garantirait :

- Une facilité d'utilisation.
- Une reproductibilité parfaite.

- Une conservation et une stabilité optimale.
- La sécurité des manipulateurs.

## **2 - Appareillage**

La technique décrite est applicable en laboratoire et nécessite, nous l'avons vu, un appareil de lecture type spectrophotomètre pour exprimer de façon quantitative la charge histaminique d'un échantillon, par lecture de la densité optique, après réaction enzymatique.

Toutefois, il est envisageable d'apprécier visuellement l'intensité de la coloration bleue développée lors de la réaction enzymatique, par comparaison à des étalons et pour des échantillons chargés à plus de 20 ppm.

Cette évaluation subjective de la couleur nous conduit donc vers un dosage qualitatif, voire semi-quantitatif, envisageable pour la détermination rapide d'un seuil d'acceptation des échantillons.

## **3 - Conclusion**

Au regard de ces différentes propositions, il semble possible d'étendre la présentation des réactifs du dosage à un "Kit terrain", prêt à l'emploi, où une gamme étalon serait réalisée de façon systématique, permettant la comparaison visuelle des échantillons.

## CONCLUSION

## CONCLUSION

Cette étude, intégrée dans une démarche nationale, voire internationale, de détermination du degré de contamination histaminique des denrées alimentaires, rend compte de la diversité des techniques de dosage déployées.

En dépit de la variété de protocoles dont peut disposer l'industriel ou l'expérimentateur, il n'en demeure pas moins que son choix reste délicat. Doit-il privilégier la précision des résultats, au détriment de la rapidité du dosage, ou peut-il se contenter de la détermination rapide d'un seuil d'acceptation ou de rejet du produit?

A l'écoute des industriels, l'Ifremer, qui maîtrise les technologies de dosage de l'histamine, très précises mais aussi plus lourdes telles que la Chromatographie Liquide Haute Performance, ou la Chromatographie Couche Mince, a choisi de s'orienter vers la recherche de mise au point de dosages réalisables rapidement et surtout accessibles à un moindre coût, aux industriels de la transformation.

En traduisant la qualité histaminique d'un lot de thons avant négociations commerciales, ou en en prouvant l'innocuité, ce dosage présente un impact industriel directement ressenti sur l'acte d'achat et sur son coût. Il évite l'apport de valeur ajoutée sur une marchandise impropre à la consommation et non conforme à la réglementation.

De surcroît, il vient supplanter l'analyse sensorielle subjective, souvent réalisée face à la carence de dosage histaminique objectif, rapide, simple et peu onéreux.

Accessible d'un point de vue économique, ce dosage peut, par choix des industriels, être rendu systématique avant chaque transformation. Il présente alors un double avantage : permettre, d'une part, l'application de la réglementation en vigueur et accroître, d'autre part, la confiance du consommateur ou du distributeur. Présenté ainsi, il apparaît comme un "critère de qualité", appréciable dans un contexte économique d'ouverture des frontières vers un marché unique.

Nous avons donc travaillé dans cette optique. L'étude qui avait pour mission la mise au point d'un protocole de dosage de l'histamine dans le thon, de façon aisée, peu onéreuse, et délivrant rapidement de nombreuses réponses simultanées, s'avère donc concluante. Notre objectif semble atteint. Toutefois, cette étude rend compte d'une première approche analytique qu'il est souhaitable de valider à l'échelle industrielle. Une transposition en laboratoire de contrôle, sur plusieurs mois, voire sur une campagne annuelle de pêche, est recommandée.

Une extension à d'autres espèces de poissons peut également être envisagée, à l'exception d'échantillons riches en amines biogènes, tel l'anchois salé, pour prendre un exemple.

Enfin, dans un souci de simplification extrême de la manipulation, nous avons envisagé une présentation des plaques à "usage unique". Elles contiendraient les réactifs sous forme déshydratée, répartis quantitativement dans chaque cupule. L'incorporation extemporanée de l'extrait de poisson à doser ou de l'étalon, solubiliserait les réactifs et la

réaction enzymatique serait alors déclenchée. Ce système calquerait le principe des galeries d'identification bactérienne de marque API.

Finalement, nous pouvons avancer avec certitude que le dosage de l'histamine de façon courante sera réalisable aisément, dans les laboratoires de contrôle de demain. Nous pensons même qu'il est tout à fait réaliste d'en envisager l'exécution dans un futur proche à partir d'un " kit terrain " à usage unique.

Cette étude rend donc compte de la faisabilité scientifique du dosage, or son extension à l'échelle industrielle semble reposer sur deux points primordiaux :

- Le positionnement des fabricants de produits chimiques. Sachant que les industriels de la conserverie sont très sensibles à l'aspect toxicologique, réglementaire et économique, une telle présentation des réactifs, proposés à un coût raisonnable, les inciterait à réaliser eux-mêmes ce dosage, et plus systématiquement. Il apparaît donc important de sensibiliser les fabricants de kits à usage unique...

- L'amélioration de la technique d'extraction de l'histamine dans le thon ou les poissons en général. Il semble qu'il y ait là une voie d'élargissement de cette étude, visant à simplifier l'étape préliminaire au dosage proprement dit.

# BIBLIOGRAPHIE

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABABOUCHE L., ALAOUI M.M. and BUSTA F.F., 1986.  
Histamine levels in commercially processed fish in Morocco. *Journal of Food Protection*, 49, 904-908.
- ABABOUCHE L. et AFILAL M.E., 1989.  
L'histamine dans la sardine marocaine fraîche et en conserves. Evolution au cours du stockage sous glace et en présence de sel. *MIRCEN Journal*, 5, 77-86.
- ALISON R. B. and TAYLOR S. L., 1982.  
Bacterial Histamine Production as a Function of Temperature and Time of incubation. *Journal of Food Science*, 47, 1311-1317.
- ANONYME, 1989.  
Quality indices - Putrescine and cadaverine. In *Manuel des méthodes d'analyse chimique, Pêche et Océans*. Chapitre 3, Section 3, 1-7.
- ANONYME, 1991.  
Le thon Germon c'est la saison. Communiqué, *Produits de la mer*, 9.
- ANONYME, 1991.  
Examen des pêcheries dans les pays membres de l'OCDE, Paris, 93-98.
- ARNOLD S.H. and BROWN W.D., 1978.  
Histamine (?) toxicity from fish product. *Advance in Food Research*, 24, 113-154.
- ASKAR A., EL-SAÏDI S., ALI A., SHEHATA M. I. and BASSIOUNY S. S., 1986.  
Biogenic amines in fish products. *Deutsche lebensmittel-Rundschau*, 82, 188-191.
- BARMAN E.T., 1969.  
Enzyme. Handbook, vol. 1, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- BILLON J., 1978.  
Intoxications alimentaires d'origine histaminique. *Revue Technique Vétérinaire de l'alimentation*, 143, 112-116.
- BOX G.E.P. and DRAPER N.R., 1987.  
Empirical model building and response surfaces. Wiley J. and Sons, New York, 668 p.
- BOYER J., DEPIERRE F., TISSIER M. et JACOB J., 1956.  
Intoxications histaminiques collectives par le thon. *Presse Médicale*, 64, 1003-1004.
- BRIAND A., 1989.  
Dosage immunoenzymatique de l'histamine. Projet de fin d'études, Institut Pasteur de Lyon, 80 p.

CHAUCHAIX D. et PAILLER F.M., 1980.  
Médecine et armées, 8, 455-462.

CHEFTEL J., CUQ J.L. et LORIENT D., 1989.  
Les principaux systèmes protéiques alimentaires. In *Protéines alimentaires*. Tech. et Doc., Lavoisier, Paris, 129-239.

COURCOUX P., 1991.  
La méthodologie des plans expérimentaux. Stage Formation Continue ENITLAA Nantes.

DABROWSKY T., KOLAKOWSKI E. and MARKIEWICK K., 1968.  
Histamin als Kennzeichen des Frischegrades der Fische. 1. Mitt. Die Veränderungen der Imidazolverbindungen im Fleischgewebe des bei 0 bis +2°C gelagerten Ostseeherings. *Die Nahrung*, 12, 631-637.

DARZACQ M., 1992.  
Qualité du thon appertisé : critères physico-chimiques. Mémoire ingénieur. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires. 76 p.

DIXON M. and WEBB E.C., 1979.  
*Enzymes*. New York, Academic Press, 1116 p.

EDMUNDS W.J. and EITENMILLER R.T., 1975.  
Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquated species. *Journal of Food Science*, 40, 516-520.

FERENCIK M., 1970.  
Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fishes. *Journal of Hygiene Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 14, 52-60.

FRANCK H.A., YOSHINAGA D.H. and NIP W.K., 1981.  
Histamine formation and honeycombing during decomposition of shipjack tuna *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. *Marine Fisheries Review*, 43, 10, 9-14.

GERARD H., ROMETTE J.L. and DURAND P., 1985.  
Prospect of using immobilised enzymes in biochemical evaluation of sea food. 15 th. ATOEPP/WEFTA Hamburg.

GOLBERG M., 1986.  
Une nouvelle technique d'analyse enzymatique des amines biogènes. Rapport final, Université Technologique de Compiègne. CU n° 85-5-500273, 33 p.

GOUYGOU J.P., SINQUIN C. and DURAND P., 1987.  
High Pressure Liquid Chromatography determination of histamine in fish. *Journal of Food Science*, 52, 925-927.



GOUPY J., 1990.

Etude comparative de divers plans d'expériences. *Revue Statistique Appliquées*, XXXVIII, 4, 5-44.

GOUPY J., 1988.

*La méthode des plans d'expériences : Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats*. Paris, Dunod, 303 p.

GUESDON J.L et CHEVRIER D., 1988.

Les techniques de dosage de l'histamine : Développements récents. *Technique et Biologie*, 4, 127-132.

KARMAS E. and MIETZ J. L., 1978.

Polyamine and histamine content of tuna fish and the relationship to decomposition. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 11, 333-337.

KARPINSKI B., 1990.

L'Arrivée en force des produits de la mer - Principales évolutions du marché. CETEVIC. Paris, 173 p.

KIMATA M. and KAWAI A., 1953.

The freshness of fish and the amount of histamine present in the meat. *Men. Research Inst. Food Sci.*, Kyoto Unio 6.

KIMATA M., 1961.

The histamine problem, in *Fish as Food*. New-York, Academic Press, vol.1., 329-352.

LAKRITZ L., SPINELLI A.M. and WASSERMAN A.E., 1975.

Determination of amines in fresh and processed pork. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 23, 344-346.

LAMY - DEHOVE, 1989.

Réglementation des produit. Tome 1, Mai 1989.

LECLERCQ M. et GUILLOUX L., 1989.

Méthodologie de dosage de l'histamine et des amines biogènes. *Technique et biologie*, 5, 212-219.

LEGROUX R., LEVADITI J. C., BOUDIN G. et BOVET D., 1947.

Intoxications histaminiques collectives consécutives à l'ingestion de thon frais. *Presse Médicale*, 54, 545-546.

LERKE P. A. and BELL L.D., 1976.

A rapid fluorimetric method for the determination of histamine in canned tuna. *Journal of Food Science*, 41, 1282-1284.

LERKE P. A., WERNER S.B., TAYLOR S.L. and GUTHERTZ L.S., 1978.

Scombroid poisoning. Report of an outbreak. *The Western Journal of Medicine*, 129, 381-386.

LERKE P.A., PORCUNA M.N. and CHIN H.B., 1983.

Screening test of histamine in fish. *Journal of Food Science*, **48**, 155-157.

LE ROUX P., 1982.

Extraits et hydrolysats protéiques de poisson, de viande et de leurs sous-produits. In *Protéines animales*. Paris, Tech. et Doc., Lavoisier, 274-2.

LUTEN J. B., 1981.

An automated fluorimetric method for the determination of histamine in canned fish products. *Journal of Food Science*, **46**, 958-959.

LUTEN J. B., 1983.

The analysis, toxicity and formation of histamine. WEFTA 13 th. annual meeting sept. 1983, IJMUIDEN.

MERCK INDEX, 1989.

U.S.A., Centennial, 11<sup>e</sup> édition.

MEURIOT E., 1986.

Tendance à long terme de la production de la pêche maritime en France. *Equinoxe*, **10**, 5-13.

MIETZ J. L. and KARMAS E., 1977.

Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, **42**, 155-158.

MONERET-VAUTRIN D.A. et MARIA Y., 1990.

Conséquences physiopathologiques de la présence des amines biogènes dans les aliments. *Technique et Biologie*, **2**, 41-47.

MOURANCHE A., 1981.

Problèmes posés par le dosage des protéines dans l'agro-alimentaire. In *Protéines foliaires et alimentation*. Gauthiers-Villars, Paris, 261 p.

NERRISSON P., 1975.

L'histamine comme indicateur d'altération. *Revue Travaux Institut Pêches maritimes*, Nantes, **39** 4, 471-482.

PARROT J.L. et NICOT G., 1970.

Absorption de l'histamine par l'appareil digestif. *Handb. D. Exp., Pharmakol, Erg. W.*, XVIII, 148-161.

PECHANEK U., PFANNHAUSER W. and WOIDICH H., 1983.

Untersuchung über den Gehalt biogener Amine in vier Gruppen von Lebensmitteln des Österreichischen Marktes. *Z. Lebensm. Unters. - Forsch.*, **176**, 335.

PICLET G., 1980.

Les poissons, In *Manuel d'alimentation humaine, Tome II : Les aliments*. E.S.F., Paris, 125-160.

PIGNAULT A., CLUZAN S., DEHAUMONT P. et HUBERT B., 1991.

Les Toxi-infections alimentaires collectives en 1990. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*, 25, 99-105.

PIQUION J.C., 1985.

Consommation des produits de la mer. *Equinoxe*, 2, 8-11.

PIQUION J.C., 1985.

Le Germon : mieux le connaitre pour mieux le pêcher. *Equinoxe*, 3, 19-26.

PLAGNOL H. et ALDRIN J.F., 1963.

Dosage de l'histamine chez les thons du golfe de Guinée. *Revue de la conserve*, 19 (1), 143-153.

QUEVAUVILLER A. et N'GUYEN Van HOA, 1965.

L'histamine dans quelques produits alimentaires d'origine occidentale ou extrême-orientale. *Bull. Soc. Hyg. Alim.*, 53, 284-294.

RENARD A.C., 1991.

Produits surgelés - Le vent en poupe. *Produits de la mer*, 8, 39-42.

RENARD A.C., 1992.

Importations - La valeur ajoutée française. *Produits de la mer*, 14, 62-67.

RITCHIE A.A. and MACKIE I.M., 1989.

Method for biogenic amines by HPLC. MAAF, Torry research station. Aberdeen, UK.

ROMETTE J.L., DURAND P., KONATE L., TRAN D. and KERNEVEZ J.P., 1982.

Electrodes à enzymes en technologie alimentaire, applications et techniques. In *Uses of enzymes in food technology*. Tech. et Doc., Lavoisier, Paris, 17-24.

SUN PAN B. and JAMES D., 1985.

Histamine in marine products : production by bactéria, measurement and prédiction of formation. FAO Fisheries Technical Paper, 252, 36p.

TAYLOR S. L. and LIEBER E. L. 1977.

Specificity and sensitivity of seven histamine detection methods. *Journal of Food Science*, 42, 1584-1586.

TAYLOR S.L., LEATHERWOOD M. and LIEBER E.R., 1978.

Histamine in Sauerkraut. *Journal of Food Science*, 43, 1030.

TAYLOR S.L. and WOJCHIK N.A., 1982  
Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae.  
*Journal of Food Protection*, 45, 747-751.

TAYLOR S.L., 1983.  
Monograph on Histamine Poisoning. Codex Alimentarines Commission, 19<sup>ème</sup> session,  
Rome.

WATTS D.A. and BROWN W.D., 1982.  
Histamine formation in abusively stored pacific mackerel : effect of CO<sub>2</sub> modified  
atmosphere. *Journal of Food Science*. 47, 1386-1387.

WEISS S., ROBB G. and coll., 1932.  
The systemic effects of histamine in man. *Archives of Internal Medecine*, 49, 360-396.

# ANNEXES

**Annexe 1 : Normes de commercialisation des poissons de mer  
(D'après LAMY-DEHOVE, 1989).**

Poissons de mer

10-406

(10-406) Barème de notation - Fraicheur

Critères				
Catégorie de fraîcheur (2)				
	Extra	A	B	Non admis
ASPECT				
Peau	pigmentation vive et caractéristique, pas de décoloration	pigmentation vive mais sans lustre	pigmentation en voie de décoloration et ternie (1)	pigmentation terne (1)
	mucus aqueux, transparent	mucus légèrement trouble	mucus laiteux	mucus opaque
Oeil	convexe (bombe)	convexe et légèrement affaissé	plat	concave au centre (1)
	cornée transparente	cornée légèrement opalescente, cornée opalescente	cornée opalescente	cornée laiteuse
	pupille noire, brillante	pupille noire, terne	pupille opaque	pupille grise
Branchies	couleur brillante	moins colorées	se décolorent	jaunâtre (1)
	pas de mucus	traces légères de mucus clair	mucus opaque	mucus laiteux
Chair (coupure dans l'abdomen)	bleuâtre, translucide, lisse brillante	veloutée creuse, feutrée	légèrement opaque	opaque (1)
	sans aucun changement de coloration originale	couleur légèrement modifiée		
Couleur le long de la colonne vertébrale	pas de coloration	légèrement rose	rose	rouge (1)
Organes	reins et résidus d'autres organes rouge brillant de même que le sang à l'intérieur de l'aorte	reins et résidus d'autres organes rouge mat, sang se décolore	reins, résidus d'autres organes et sang rouge pâle	reins, résidus (1) d'autres organes et sang brunâtre
ETAT				
Chair	ferme et élastique	élasticité diminuée	légèrement molle (flasque), élasticité diminuée	molle (flasque)
	surface lisse		surface creuse (veloutée) et ternie	écaille se détachant facilement de la peau; surface granuleuse
Colonne vertébrale	se brise au lieu de se détacher	adhérente	peu adhérente	non adhérente (1)
Péritoine	adhérent totalement à la chair	adhérent	peu adhérent	non adhérent (1)
		ODEUR		
Branchies, peau, cavité abdominale	algue marine	ni d'algue, ni mauvaise	légèrement putride	putride (1)

(1) Ou dans un stade d'altération plus avancé.

(2) En ce qui concerne la baudroie aléutée, les classements se feront sur la base des rubriques qui lui sont applicables.

**Annexe 2 :** Protocole du dosage de l'histamine par la méthode biologique de Henry (1960)  
(D'après PLAGNOL, 1963).

**1) Préparation des extraits**

L'échantillon (1 g) est broyé au mortier avec du sable. Puis après avoir ajouté 9 ml de liquide de Tyrode, on porte à l'ébullition pendant 3 mn. Après refroidissement on filtre sur verre fritté, on lave avec du Tyrode, on ajuste à pH 7,4 et on complète à 25 ml.

Pour les jus de boîtes, nous n'avons pas procédé à cette hydrolyse, nous les avons fait agir directement sur l'intestin. Les pH étaient compris entre 6,2 et 6,4.

**2) Liquide de survie**

(Solution de Tyrode)

TYRODE CONCENTRÉ

Chlorure de sodium . . . . .	800 g
Chlorure de potassium . . . . .	20 g
Chlorure de magnésium . . . . .	10 g
Eau ordinaire . . . . .	5 litres

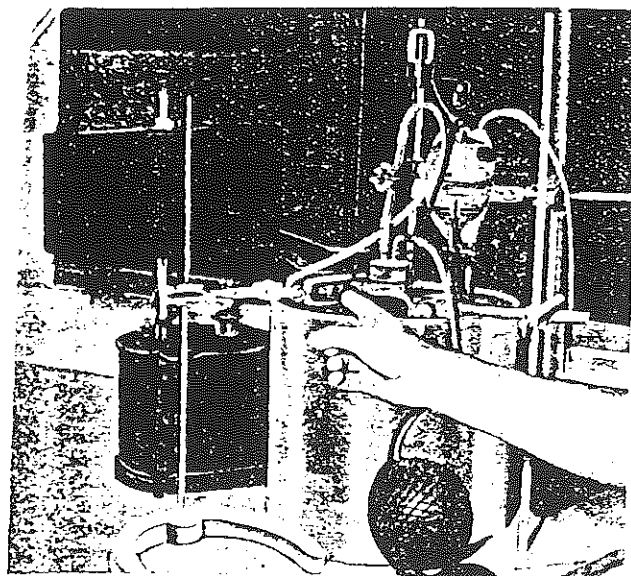
Cette solution est conservée au réfrigérateur.

TYRODE DILUÉ

Eau ordinaire . . . . .	950 ml
Bicarbonate de sodium . . . . .	1 g
Glucose . . . . .	1 g
Sulfate d'atropine . . . . .	0,5 mg
Tyrode concentré . . . . .	50 ml

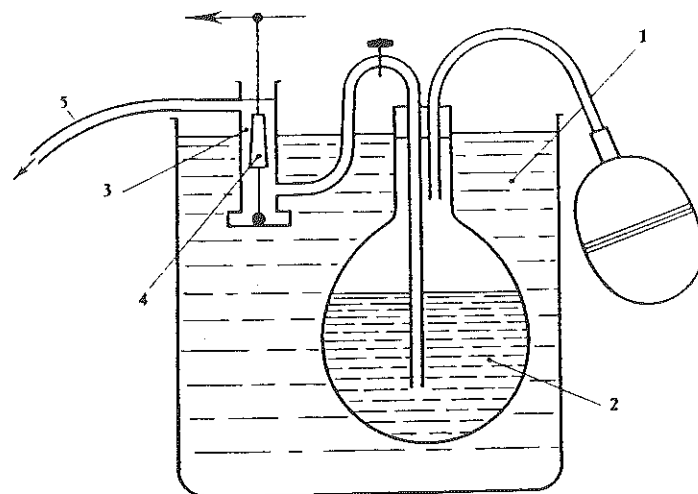
**3) Dosage**

- Température : 35°
- Fragment d'intestin de 2 cm, prélevé sur un animal à jeun depuis 24 heures, sacrifié par section carotidienne, à une dizaine de centimètres de la valvule iléo-cœcale. Cuve décrite par Lauenoy et Lagodsky (12).
- Sensibilisation, gamme et encadrement des résultats avec une solution de bichlorhydrate d'histamine à 0,3 mg/l dans la solution de Tyrode.
- Identification à plusieurs reprises de l'histamine par suppression de l'effet contracturant à l'aide d'une solution à 0,2 mg/l de néo-antergan.



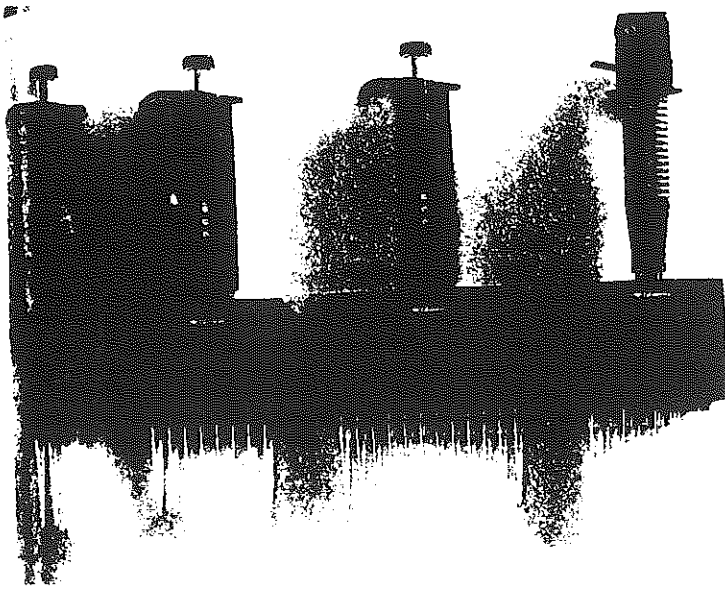
**Appareillage utilisé...**

**...et schéma de principe de son montage**



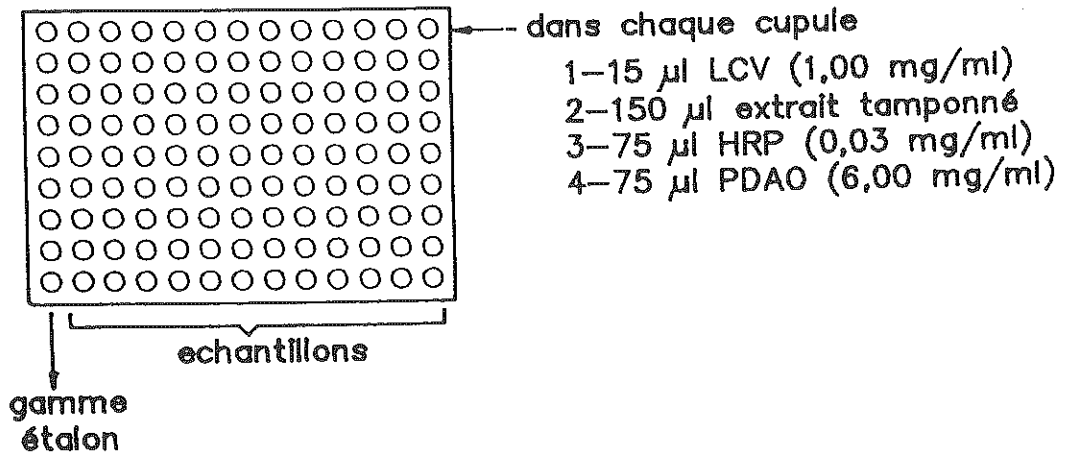
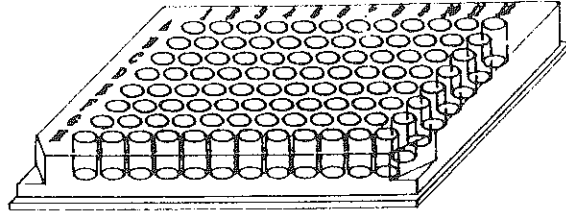
- 1 Bain-marie à température constante 35°C.
- 2 Liquide de perfusion (Tyrode).
- 3 Cuve à volume constant.
- 4 Fragment d'intestin.
- 5 Trompe à vide.

Annexe 3: Présentation de pipettes automatiques multicanaux.

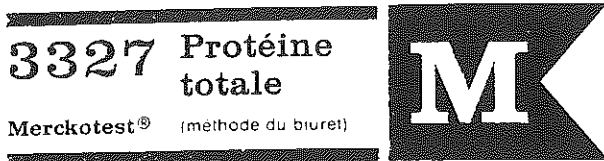




**Annexe 4** : Schéma d'une plaque de microtitration standardisée, de 96 puits (ou cupules).



## Annexe 5 : Protocole de dosage des protéines – Utilisation d'un "kit" Biuret (Merck 3327).



Série complète de réactifs pour environ 100 à 180 dosages photométriques de la protéine sérique et plasmatique

### Principe

Contrairement aux autres composés azotés, tels que, par exemple, la créatinine, l'urée et l'acide urique, les protéines et les peptides donnent avec des ions cuivre, en solution alcaline, un complexe de couleur violette. La réaction dite « du biuret » est très facilement praticable. Les résultats sont reproductibles et bien en accord avec la méthode de Kjeldahl.

### Appareillage

Spectrophotomètre ou photomètre à filtres.

### Réactifs

- ① Réactif du biuret (concentré)
- ② Réactif de référence (concentré)
- ③ Etalon (6 de albumine/100 ml)

Conserver hors de la portée des enfants.

En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé. Porter des gants appropriés et un appareil de protection des yeux/du visage.

En flacons bien fermés, tous les réactifs se conservent (à -15° - -25° C) jusqu'à la date limite indiquée pour l'utilisation.

### Solutions

- (1) **Réactif du biuret:** tartrate de K-Na 32 mmol/l; KI 18 mmol/l; CuSO<sub>4</sub>, 12 mmol/l; NaOH 200 mmol/l.  
Compléter le contenu d'un flacon ① à 500 ml avec de l'eau bidistillée. Filtrer au besoin. En flacons bien fermés, cette solution se conserve un an à la température ambiante.
- (2) **Réactif de référence:** tartrate de K-Na 32 mmol/l; NaOH 200 mmol/l; Compléter le contenu du flacon ② à 500 ml avec de l'eau bidistillée. En flacons bien fermés, cette solution se conserve un an à la température ambiante.

### Mode opératoire

Ne prévoir un **essai à blanc** que pour les sérums hémolytiques, icteriques et troubles ou les étalons sériques.

Préparer un seul **étalon** pour chaque série d'analyses. Si, dans les différentes séries d'analyses, la densité optique de l'étalon est assez bien reproductible, on peut renoncer à l'analyse d'autres étalons. Secouer l'étalon sérique avant de l'employer. Les précipitations floconneuses pouvant surgir le cas échéant n'influencent pas le résultat de l'analyse.

Pipetter dans des tubes à essais:

	Echantillon	Essai à blanc de l'échantillon	Etalon	Essai à blanc de l'étalon
Sérum ou plasma	0,1 ml	0,1 ml	—	—
Etalon sérique ③	—	—	0,1 ml	0,1 ml
Réactif du biuret (1)	5,0 ml	—	5,0 ml	—
Réactif de référence (2)	—	5,0 ml	—	5,0 ml

Mélanger, laisser reposer 30 minutes à la température ambiante. Mesurer les densités optiques de l'échantillon et de l'étalon par rapport au réactif du biuret (1), et les densités optiques des essais à blanc par rapport à l'eau.

Maximum de la densité optique : 545 nm Epaisseur de la cuve : 1 cm  
Filtre : entre 530 et 565 nm, p. ex. raie Hg 546 nm

### Calcul

a) Quand on utilise l'étalon :

$$\text{Concentration en protéine} = \frac{DO_A - DO_{EA}}{DO_E - DO_{EE}} \cdot 6 \text{ g/100 ml}$$

b) Quand on utilise un spectrophotomètre (546 nm) ou un photomètre à filtres avec une lampe à vapeur de mercure et un filtre pour 546 nm

$$\text{Concentration en protéine} = (DO_A - DO_{EA}) \cdot 19 \text{ g/100 ml}$$

DO<sub>A</sub> = Densité optique de l'échantillon analysé

DO<sub>E</sub> = Densité optique de l'étalon

DO<sub>EA</sub> = Densité optique de l'essai à blanc de l'échantillon analysé (peut être considérée comme égale à 0,010 pour des sérums qui ne nécessitent pas un essai à blanc)

DO<sub>EE</sub> = Densité optique de l'essai à blanc de l'étalon

### Valeurs normales

- Adultes et enfants à partir de 3 ans : 6,7 à 8,7 g/100 ml de sérum  
Enfants au-dessous de 3 ans : 5,4 à 8,7 g/100 ml de sérum  
Nouveau-nés : 5,2 à 9,1 g/100 ml de sérum  
Adultes et enfants : 15 à 45 mg/100 ml de liquide céphalo-rachidien (lombaire)  
Nouveau-nés : jusqu'à 90 mg/100 ml de liquide céphalo-rachidien (lombaire)

### Etalonnage

Il est possible d'étalonner des photomètres à filtres sans lampe à vapeur de mercure à l'aide de l'étalon sérique et il est indiqué d'étalonner de temps en temps aussi les autres instruments dans le but de contrôler les pipettes, l'appareil de mesure et la technique employée. Dans ce but, procéder à six analyses standard. L'écart des densités optiques ne doit pas être supérieur à 0,025. A partir de la moyenne des densités optiques, déterminer le facteur de calcul F selon l'expression suivante :

$$F = \frac{6}{DO_E - DO_{EE}}$$

A l'aide du facteur F, la concentration en protéine peut être déterminée selon l'expression suivante :

$$\text{Concentration en protéine} = (DO_A - DO_{EA}) \cdot F \text{ g/100 ml}$$

### Remarques

- Pour étalonner l'étalon sérique, les facteurs suivants ont été utilisés.
  - Facteur moyen pour la conversion de l'azote selon Kjeldahl (azote total moins azote résiduel) en protéine sérique selon Kjeldahl = 6,54
  - Facteur moyen pour la conversion des densités optiques (546 nm) obtenues suivant la présente méthode (DO<sub>A</sub> - DO<sub>EA</sub>) en protéine sérique de Kjeldahl = 19.

Dans des cas particuliers, des écarts de ces facteurs peuvent se présenter tant dans la méthode de Kjeldahl que dans celle du biuret. Etant donné que la concentration « authentique » en protéine n'est obtenue ni par l'une ni par l'autre méthode, il est recommandé d'utiliser les facteurs moyens indiqués.
- Le facteur de conversion 6,25 (concentration de l'azote en concentration protéique) est fréquemment utilisé à la place du facteur 6,54. Si l'on a l'intention de se baser sur le facteur 6,25, les résultats obtenus selon les expressions indiquées doivent être multipliés par 0,96.
- A l'aide de la méthode du biuret, il est également possible de déterminer la concentration en protéine des précipités de l'acide trichloracétique. Seule une précipitation quantitative des protéines permet de conclure à la concentration en protéine de l'échantillon avant la désalbumination.  
On dissout le précipité, qui doit contenir 2 à 20 mg de protéine, dans 0,5 ml de soude caustique à 3% et on y ajoute 5 ml de réactif du biuret en solution (1). Après 30 minutes, mesurer la densité optique à 546 nm par rapport à un essai à blanc composé de 5 ml de réactif du biuret en solution (1) et de 0,5 ml d'eau.  
Dans ces cas, l'étalon sérique ne peut souvent être utilisé que pour un étalonnage approximatif. Pour des mesures précises, il est préconisé de déterminer une fois, à l'aide de la protéine en question, le facteur de conversion du taux protéique établi selon Kjeldahl – et déterminé séparément selon point 4 – en densité optique obtenue suivant la méthode du biuret. Ce facteur de conversion remplace le facteur 19 cité plus haut. Si ce facteur de calcul n'est pas disponible, calculer approximativement selon l'expression suivante :  
Concentration en protéine = DO<sub>A</sub> · 20 mg/prise d'essai
- Pour déterminer la concentration en protéine du liquide céphalo-rachidien, utiliser le réactif du biuret concentré sans dilution préalable. Mélanger 2 ml de liquide céphalo-rachidien avec 0,2 ml de réactif du biuret concentré ③, laisser reposer 30 minutes et centrifuger le cas échéant. Mesurer ensuite à 546 nm la densité optique du liquide surnageant par rapport à un essai à blanc composé de 2 ml d'eau et de 0,2 ml de réactif biuret concentré ③.  
Concentration en protéine = DO<sub>A</sub> · 400 mg/100 ml
- Le sérum ou plasma de patients ayant reçu par voie i.v. d'importantes quantités de polydextrans, donne des taux protéiques trop élevés selon la méthode du biuret. Dans ce cas, déterminer la concentration en protéine selon la méthode de Kjeldahl.

### Bibliographie

- R. J. Henry, Clinical Chemistry, Harper & Row Publishers, New York 1964, p. 181
- G. Josephson et C. Gyllenswärd, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 9, 29 (1957)
- T. E. Wechselbaum, Amer. J. Clin. Path., Bull. 10, 40 (1948)
- F. W. Sunderman et autres, Amer. J. Clin. Path. 30, 112 (1958)

Fabricant : E. Merck, B.P. 4119, D-6100 Darmstadt 1, R.F.A.

Distributeur en France : Laboratoires MERCK-CLEVENOT S.A., B.P. 44, 77500 Chelles

Diagnostica

MERCK

## Annexe 6 : Protocole du micro-dosage des protéines – Utilisation d'un kit Lowry (Sigma 690).

### BACKGROUND AND PRINCIPLE OF TEST

The biuret<sup>1</sup> and Lowry<sup>2</sup> procedures are used as standard methods for protein determination. The former is widely used for clinical assays. The latter, though more sensitive, is used for investigative work and is limited by (a) poor stability of combined reagents, (b) non-reproducibility of color, especially at low protein concentration, and (c) non-linear chromogenic response with protein concentration.

Ohnishi and Barr<sup>3</sup> modified the biuret reagent for the Lowry procedure, thereby simplifying it, while improving the stability of the combined reagent. The procedure described here is a modification of their method. The volume of specimen required has been reduced and the use of a Vortex mixer has been eliminated. Biuret reagent is reacted with protein solution followed by phenol reagent. After development, the color is read at a suitable wavelength between 550 and 750 nm (maximum color observed at 700-750 nm).

### REAGENTS: PROVIDED

(For Research Use Only  
Not for use in diagnostic procedures)

**BIURET REAGENT**, Catalog No. 690-1  
Cupric sulfate, 0.75 mmol/L, and sodium hydroxide, 94 mmol/L. Also contains tartrate, iodide and carbonate. Store in refrigerator (2-8°C).

**FOLIN AND CIOCALTEU'S REAGENT**, Catalog No. 690-2  
2.0 Normal. Store at room temperature (18-26°C)

**PROTEIN STANDARD**, Catalog No. 690-10  
Albumin (bovine), 10 g/dL, in sodium chloride solution, 0.85%. Sodium azide, 0.5%, added as preservative. Store in refrigerator (2-6°C).

**WARNING:** Protein Standard contains sodium azide. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide accumulation.

### PROCEDURE

1. Dilute the test sample with Sodium Chloride Solution so that the final protein concentration is between 15 and 100 mg/dL (150 and 1000 µg/mL).
2. Label two or more small test tubes: Blank, Test 1, Test 2.
3. To Blank, add 0.2 mL Sodium Chloride Solution.
4. To Test, add 0.2 mL diluted Test sample solution prepared in step 1.
5. Add to each, 2.2 mL Biuret Reagent, Catalog No. 690-1. Mix well and allow to stand at room temperature (18-26°C) for 10 minutes.
6. Add 0.1 mL of Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent, Catalog No. 690-2. Mix each tube well immediately after addition. Allow to stand at room temperature (18-26°C) for 30 minutes.
7. Transfer contents of tubes to cuvetts and read absorbance using Blank as reference at the same wavelength and on the same instrument used to prepare your calibration curve. Complete reading within 30 minutes.
8. Determine the protein concentration (mg/dL or µg/mL) of the diluted Test sample from your calibration curve. Multiply by the dilution factor to obtain protein concentration in the Test sample.

### CALIBRATION

1. Pipet 0.5 mL of Protein Standard, Catalog No. 690-10, into a 50-mL volumetric flask. Dilute to 50 mL with Sodium Chloride Solution.
2. Pipet into 5 test tubes the solutions indicated in columns 2 and 3 below:

Test Tube No.	Diluted Protein Standard Step 1 (mL)	Sodium Chloride Solution (mL)	Protein (mg/dL)
1	0.00	0.20	0
2	0.05	0.15	25
3	0.10	0.10	50
4	0.15	0.05	75
5	0.20	0.00	100

3. Add to each tube 2.2 mL Biuret Reagent, Catalog No. 690-1. Mix well and allow to stand at room temperature (18-26°C) for 10 minutes.
4. Add to each tube 0.1 mL of Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent, Catalog No. 690-2. Mix each tube well immediately after addition.
5. Allow to stand at room temperature (18-26°C) for 30

### REAGENTS: REQUIRED BUT NOT PROVIDED

#### SODIUM CHLORIDE SOLUTION, 0.85 g/dL

Available as a solution, Catalog No. 430AG-4, or as a GAL-PAC, Catalog No. 430AG-4GP. Alternatively, the solution can be prepared by dissolving 8.5 g Sodium Chloride, Catalog No. S 9625, in 1 liter distilled or deionized water. Store at room temperature (18-26°C).

### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Since the method is very sensitive, the specimen is diluted so that the final protein concentration is between 15 and 100 mg/dL (150 to 1000 µg/mL). Dilution can be made with Sodium Chloride Solution.

### INTERFERING SUBSTANCES

All glassware must be free of protein. This assay is dependent on the tryptophan and tyrosine content of proteins. Therefore, the presence of either of these as free amino acid contaminants will interfere. Glycine decreases the color with protein by up to fifty percent. Ammonium sulfate at a final concentration above 0.15 percent decreases color development.<sup>1</sup> Most phenols, except nitrophenol, reduce the reagent (i.e., some color change may occur). Uric acid, guanine and xanthine react with the phenol reagent, whereas guanidine does not react appreciably.<sup>2</sup> The procedure also is affected by potassium ions,<sup>3</sup> magnesium ions,<sup>4</sup> EDTA,<sup>5</sup> thiol reagent,<sup>6</sup> tris<sup>7</sup> and some carbohydrates.<sup>8,9</sup>

### INSTRUMENT AND MATERIALS REQUIRED

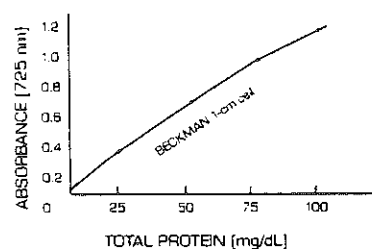
Instrument: Any colorimeter or spectrophotometer which transmits light between 550-750 nm.

#### Materials

Cuvets	Pipets
Test tubes	Graph paper

6. Transfer to cuvetts and read absorbance at 550-750 nm (maximum color at 700-750 nm) using tube 1 as reference.
7. Plot the absorbance values versus protein concentration (column 4). A curved line passing through the origin should be obtained. [See typical calibration curve.] Alternatively, the absorbance values can be plotted versus protein concentration on logarithmic paper (2 cycle). A straight line should be obtained.

TYPICAL CALIBRATION CURVE



#### LIMITATION

The procedure becomes insensitive above protein concentration of 100 mg/dL (1000 µg/mL). Protein concentration above this level can be assayed by diluting sample appropriately with Sodium Chloride Solution.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Reproducibility** studies were performed by replicate analyses on 4 protein samples having mean protein values of 25, 50, 75 and 100 mg/dL. Standard deviations were found to be 0.3, 0.67, 0.73 and 1.65 mg/dL and the coefficients of variation 1.16, 1.33, 0.98 and 0.65%, respectively.

**Correlation** studies were accomplished by comparison of results obtained from the assay of 10 protein samples having protein values ranging from 19 to 120 mg/mL by the procedure described and by the method of Ohnishi and Barr.<sup>3</sup> Statistical analysis of the values obtained revealed a correlation coefficient of 0.990.

**Recovery** studies were conducted by adding protein to 0.85% sodium chloride solution producing protein levels of 25, 50, 75 and 100 mg/dL. Recoveries were found to be 102, 101, 99 and 98%, respectively.

Sigma warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma publications. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



### PRINCIPE

Cette méthode s'applique aux poissons entiers, éviscérés ou non, aux filets, aux darnes frais congelés, salins ou fumés.

Séparation de ces protéines par isoélectrofocalisation sur un gel de polyacrylamide suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

### APPAREILLAGE

- Appareil pour électrofocalisation : système Multiphor LKB 2117
- Alimentation stabilisée à puissance constante LKB 2103
- Cryostat à circulation HAAKE assurant un circuit d'eau réfrigérée à + 8° C dans la plaque de refroidissement
- Seringue type SMI Micro-Pettor pour les dépôts
- Broyeur type TURMIX
- Centrifugeuse

### REACTIFS

- LKB Ampholine PAG plates - pH 3,5 - 9,5
- Solutions électrodes : NaOH 1 M pour la cathode  
N<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M pour l'anode
- Solution colorante :  
Dissoudre 0,250 g de bleu de Coomassie dans 75 ml de méthanol puis ajouter 155 ml d'eau distillée, 8 g d'acide sulfosalicylique et 25 g de trichloracétique - (bleu de Coomassie R 250 Merck 12553)
- Solution décolorante :  
A 1.000 ml d'eau distillée, ajouter 120 ml d'acide acétique + 375 ml d'éthanol absolu
- Solution glycérol-éthanol-acide :  
10 ml de glycérol dans 100 ml de solution décolorante
- Marqueurs de points isoélectriques :
  - Iselectric Point Marker pI calibration - pH 5,65 - 8,3 (commercialisé par la firme BDH - réf. 44286 2 V.BPS)
  - Sigma IEF MIX pH 3,6 - 6,6 (réf. 30 H 9481)

## MODE OPERATOIRE

### Préparation de l'échantillon

Mesurer la concentration protéique du surnageant (méthode du biuret "Merkotest" - réf. 3327 Merck) et faire la dilution nécessaire pour obtenir une concentration finale de 10 mg/ml. L'extrait doit être utilisé dans les vingt quatre heures.

### Séparation des protéines hydrosolubles

La plaque réfrigérante dont la température est maintenue à + 8° C est enduite d'une fine couche de pétrole lampant afin d'assurer une meilleure conduction thermique. Appliquer dessus le calque servant de repère, en ayant soin d'éliminer les bulles d'air. La plaque de polyacrylamide est déposée sur le calque après y avoir mis une nouvelle couche de pétrole.

Disposer ensuite sur le gel aux endroits prévus à cet effet, les cartons préalablement imprégnés de NaOH pour la cathode et de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pour l'anode. Procéder au dépôt de 10 µl d'extrait de chaque échantillon directement sur le gel à l'aide d'une micro-seringue. Bien que la place des dépôts sur le gel ne modifie pas la position finale des bandes, ceux-ci ont été effectués à chaque fois dans la zone cathodique, à environ un centimètre de l'électrode. Pour chaque demi-plaque, inclure un dépôt du marqueur de pH.

Placer le couvercle prote-électrodes, puis celui relié à la source électrique. Les conditions électriques pour une demi-plaque sont les suivantes : voltage **2.000 V** intensité **50 mA** , puissance **30 W** ; le temps de focalisation est de une heure trente.

### Coloration au bleu de Coomassie

La coloration-fixation du gel se fait en une seule étape pendant quinze minutes à 60° C dans la solution colorante préparée au moment de l'emploi.

La décoloration se fait ensuite par passages successifs du gel dans la solution décolorante. Pour faciliter la décoloration et éliminer les traces de colorant, on frotte délicatement la surface du gel avec un coton trempé dans la solution décolorante.

Après disparition complète du fond bleu dans le gel (vingt quatre à quarante huit heures), celui-ci est séché. Pour ce faire, le gel est immergé une heure dans la solution glycérol-éthanol-acide, puis séché trois à quatre heures à l'étuve à 45° C et enfin fixé définitivement en appliquant une feuille de plastique préalablement trempée dans la solution de glycérol.

Les gels, une fois colorés et fixés, sont prêts pour l'analyse visuelle et densitométrique.

**Annexe 8 : Résultats obtenus par le test T de Student : calcul de l'erreur expérimentale commise lors du pipettage.**

Two-Sample Analysis Results

Sample Statistics:	Sample 1	Sample 2	Pooled
Number of Obs.	7	7	14
Average	0.151429	0.143266	0.147357
Variance	1.44952E-4	2.14238E-4	1.79595E-4
Std. Deviation	0.0120396	0.0146369	0.0134013
Median	0.153	0.147	0.152
Difference between Means = 8.14286E-3			
Conf. Interval For Diff. in Means: 95 Percent			
(Equal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-7.46867E-3	0.0237544	12 D.F.
(Unequal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-7.53337E-3	0.0238191	11.6 D.F.
Ratio of Variances = 0.676595			
Conf. Interval for Ratio of Variances: 0 Percent			
Sample 1 ÷ Sample 2			
Hypothesis Test for H0: Diff = 0		Computed t statistic = 1.13675	
vs Alt: NE		Sig. Level = 0.277835	
at Alpha = 0.05		so do not reject H0.	

**Annexe 9 : Résultats obtenus par le test T de Student : calcul de l'erreur expérimentale commise lors de la préparation des réactifs.**

Two-Sample Analysis Results

Sample Statistics:	ERREUR.B	ERREUR.C	Pooled
Number of Obs.	8	8	16
Average	0.03675	0.04175	0.03925
Variance	1.42786E-4	2.15071E-4	1.78929E-4
Std. Deviation	0.0119493	0.0146653	0.0133764
Median	0.0385	0.042	0.04
Difference between Means = -5E-3			
Conf. Interval For Diff. in Means: 95 Percent			
(Equal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-0.0193484	9.3484E-3	14 D.F.
(Unequal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-0.0194035	9.40354E-3	13.5 D.F.
Ratio of Variances = 0.663899			
Conf. Interval for Ratio of Variances: 0 Percent			
Sample 1 ÷ Sample 2			
Hypothesis Test for H0: Diff = 0		Computed t statistic = -0.747584	
vs Alt: NE		Sig. Level = 0.467083	
at Alpha = 0.05		so do not reject H0.	

**Annexe 10 : Résultats obtenus par le test F de Fisher : détermination de l'effet jour.**

Multiple range analysis for **Extrait**

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

10	4	.0035000	X
0	7	.0124286	X

contrast	difference +/-	limits
0 - 10	0.00893	0.01456

\* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for **Hista. 1j.**

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

0	16	.0392500	X
10	4	.0612500	X

contrast	difference +/-	limits
0 - 10	-0.02200	0.01440 *

\* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for **Hista. 10j.**

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

0	4	.1487500	X
10	4	.1617500	X

contrast	difference +/-	limits
0 - 10	-0.01300	0.02150

\* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for **Viellissement extrait**

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

0	7	.0124571	X
1	4	.0362500	X

contrast	difference +/-	limits
0 - 1	-0.02379	0.01739 *

\* denotes a statistically significant difference.

Multiple range analysis for **Viellissement hista.**

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
-------	-------	---------	--------------------

0	16	.0392500	X
10	4	.1487500	X
1	4	.2080000	X

contrast	difference +/-	limits
0 - 1	-0.16875	0.01551 *
0 - 10	-0.10950	0.01551 *
1 - 10	0.05925	0.01961 *

\* denotes a statistically significant difference.



**Annexe 11 : Résultats obtenus par le test F de Fisher : résultats du PFF.**

Estimated effects for ppm\_2 - PFF 4-1

average	=	70.135	+/-	17.1478
A:PDAO	=	-22.8375	+/-	38.3437
B:HRP	=	-59.2375	+/-	38.3437
C:LCV	=	111.687	+/-	38.3437
D:TEMPERATUR	=	-3.31	+/-	34.2956
AB + CD	=	0.5125	+/-	38.3437
AC + BD	=	-29.5625	+/-	38.3437
AD + BC	=	-53.2625	+/-	38.3437

Standard error estimated from total error with 2 d.f. (t = 4.30265)

ANOVA for ppm\_2 - PFF 4-1

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	F-value
A:PDAO	1043.1028	1	1043.103	.35	.6175
B:HRP	7018.1628	1	7018.163	2.39	.2624
C:LCV	24948.1953	1	24948.195	8.48	.1094
D:TEMPERATUR	27.3902	1	27.390	.01	.9328
AB + CD	.5253	1	.525	.00	.9907
AC + BD	1747.8828	1	1747.883	.59	.5286
AD + BC	5673.7878	1	5673.788	1.93	.2993
Total error	5880.9531	2	2940.477		

Total (corr.) 46340.0003 9

R-squared = 0.873091

Estimated effects for ppm\_5 - PFF 4-1

average	=	109.91	+/-	14.3183
A:PDAO	=	0.075	+/-	32.0168
B:HRP	=	-74.925	+/-	32.0168
C:LCV	=	182.625	+/-	32.0168
D:TEMPERATUR	=	-6.18	+/-	28.6367
AB + CD	=	9.125	+/-	32.0168
AC + BD	=	-11.125	+/-	32.0168
AD + BC	=	-66.225	+/-	32.0168

Standard error estimated from total error with 2 d.f. (t = 4.30265)

ANOVA for ppm\_5 - PFF 4-1

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	F-value
A:PDAO	.0112	1	.011	.00	.9984
B:HRP	11227.5113	1	11227.511	5.48	.1441
C:LCV	66703.7812	1	66703.781	32.54	.0294
D:TEMPERATUR	95.4810	1	95.481	.05	.8512
AB + CD	166.5312	1	166.531	.08	.8051
AC + BD	247.5312	1	247.531	.12	.7647
AD + BC	8771.5013	1	8771.501	4.28	.1745
Total error	4100.3005	2	2050.150		

Total (corr.) 91312.6490 9

R-squared = 0.955096

Estimated effects for ppm\_10 - PFF 4-1

average	=	173.12	+/-	9.03558
A:PDAO	=	59.575	+/-	20.2042
B:HRP	=	-33.375	+/-	20.2042
C:LCV	=	295.025	+/-	20.2042
D:TEMPERATUR	=	19.16	+/-	18.0712
AB + CD	=	32.425	+/-	20.2042
AC + BD	=	55.725	+/-	20.2042
AD + BC	=	-33.025	+/-	20.2042

Standard error estimated from total error with 2 d.f. (t = 4.30265)

ANOVA for ppm\_10 - PFF 4-1

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	F-value
A:PDAO	7098.361	1	7098.36	8.69	.0983
B:HRP	2227.781	1	2227.78	2.73	.2404
C:LCV	174079.501	1	174079.50	213.22	.0047
D:TEMPERATUR	917.764	1	917.76	1.12	.4001
AB + CD	2102.761	1	2102.76	2.58	.2497
AC + BD	6210.551	1	6210.55	7.61	.1102
AD + BC	2181.301	1	2181.30	2.67	.2438
Total error	1632.834	2	816.42		

Total (corr.) 196450.856 9

R-squared = 0.991688

Estimated effects for ppm\_30 - PFF 4-1

average	=	212.89 +/- 9.00473
A:PDAO	=	100.85 +/- 20.1352
B:HRP	=	5.6 +/- 20.1352
C:LCV	=	391.6 +/- 20.1352
D:TEMPERATUR	=	19.34 +/- 18.0095
AB + CD	=	25.85 +/- 20.1352
AC + BD	=	97.05 +/- 20.1352
AD + BC	=	6.6 +/- 20.1352

Standard error estimated from total error with 2 d.f. (t = 4.30265)

ANOVA for ppm\_30 - PFF 4-1

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	P-value
A:PDAO	20341.445	1	20341.44	25.09	.0376
B:HRP	62.720	1	62.72	.08	.8097
C:LCV	306701.120	1	306701.12	378.25	.0026
D:TEMPERATUR	935.089	1	935.09	1.15	.3952
AB + CD	1336.445	1	1336.44	1.65	.3279
AC + BD	18837.405	1	18837.40	23.23	.0405
AD + BC	87.120	1	87.12	.11	.7773
Total error	1621.705	2	810.85		
Total (corr.)	349923.049	9			

R-squared = 0.995366

Estimated effects for ppm\_60 - PFF 4-1

average	=	244.04 +/- 15.4592
A:PDAO	=	81.5 +/- 34.5678
B:HRP	=	-3.6 +/- 34.5678
C:LCV	=	426.25 +/- 34.5678
D:TEMPERATUR	=	-16.32 +/- 30.9184
AB + CD	=	29.25 +/- 34.5678
AC + BD	=	106.1 +/- 34.5678
AD + BC	=	30 +/- 34.5678

Standard error estimated from total error with 2 d.f. (t = 4.30265)

ANOVA for ppm\_60 - PFF 4-1

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	P-value
A:PDAO	13284.500	1	13284.50	5.56	.1424
B:HRP	25.920	1	25.92	.01	.9275
C:LCV	363378.125	1	363378.12	152.05	.0065
D:TEMPERATUR	665.856	1	665.86	.28	.6553
AB + CD	1711.125	1	1711.12	.72	.4946
AC + BD	22514.420	1	22514.42	9.42	.0718
AD + BC	1800.000	1	1800.00	.75	.4852
Total error	4779.738	2	2389.87		
Total (corr.)	408159.684	9			

R-squared = 0.98829

Estimated effects for ppm\_100 - PFF 4-1

average	=	214.1 +/- 11.333
A:PDAO	=	65.55 +/- 25.3413
B:HRP	=	-13.85 +/- 25.3413
C:LCV	=	397 +/- 25.3413
D:TEMPERATUR	=	15.6 +/- 22.6659
AB + CD	=	32.15 +/- 25.3413
AC + BD	=	64.8 +/- 25.3413
AD + BC	=	-18.1 +/- 25.3413

Standard error estimated from total error with 2 d.f. (t = 4.30265)

ANOVA for ppm\_100 - PFF 4-1

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	P-value
A:PDAO	8593.605	1	8593.61	6.69	.1226
B:HRP	383.645	1	383.64	.30	.6447
C:LCV	315218.000	1	315218.00	245.43	.0040
D:TEMPERATUR	608.400	1	608.40	.47	.5689
AB + CD	2067.245	1	2067.24	1.61	.3322
AC + BD	8398.080	1	8398.08	6.54	.1249
AD + BC	655.220	1	655.22	.51	.5559
Total error	2568.725	2	1284.36		
Total (corr.)	338492.920	9			

R-squared = 0.992411

**Annexe 12 : Résultats obtenus par le test F de Fisher : PFF 2<sup>3</sup>-1.**

Estimated effects for ppm_2			Estimated effects for ppm_5		
average	=	16.1024 +/- 3.83659	average	=	40.4024 +/- 4.67106
A:pdoao + BC	=	7.42143 +/- 9.39765	A:pdoao + BC	=	22.3286 +/- 11.4425
B:hrp + AC	=	-0.564286 +/- 9.39765	B:hrp + AC	=	-9.9 +/- 11.4425
C:temp	=	50.5143 +/- 13.2903	C:temp	=	82.3286 +/- 16.1821
AB	=	23.45 +/- 16.2773	AB	=	-5.95714 +/- 19.8189
block	=	-40.3714 +/- 18.7954	block	=	-90.4381 +/- 22.8849
block	=	-32.8048 +/- 18.7954	block	=	-61.7048 +/- 22.8849
block	=	-15.5714 +/- 18.7954	block	=	-23.0714 +/- 22.8849
block	=	9.59524 +/- 18.7954	block	=	29.9266 +/- 22.8849
block	=	42.6619 +/- 18.7954	block	=	93.8286 +/- 22.8849
block	=	81.4619 +/- 18.7954	block	=	157.695 +/- 22.8849

Estimated effects for ppm_10			Estimated effects for ppm_30		
average	=	111.026 +/- 8.56291	average	=	149.226 +/- 10.5832
A:pdoao + BC	=	56.6143 +/- 20.9748	A:pdoao + BC	=	101.714 +/- 25.9236
B:hrp + AC	=	-6.75714 +/- 20.9748	B:hrp + AC	=	-5.55714 +/- 25.9236
C:temp	=	57.5571 +/- 29.6628	C:temp	=	95.1571 +/- 36.6615
AB	=	-35.7571 +/- 36.3294	AB	=	-108.757 +/- 44.9009
block	=	-149.219 +/- 41.9495	block	=	-215.986 +/- 51.8471
block	=	-103.119 +/- 41.9495	block	=	-142.919 +/- 51.8471
block	=	-43.6857 +/- 41.9495	block	=	-38.819 +/- 51.8471
block	=	47.281 +/- 41.9495	block	=	88.981 +/- 51.8471
block	=	160.048 +/- 41.9495	block	=	226.581 +/- 51.8471
block	=	278.114 +/- 41.9495	block	=	346.048 +/- 51.8471

Estimated effects for ppm_60			Estimated effects for ppm_100		
average	=	189.862 +/- 13.897	average	=	122.631 +/- 9.82079
A:pdoao + BC	=	78.2214 +/- 34.0406	A:pdoao + BC	=	70.9714 +/- 24.0559
B:hrp + AC	=	-9.79286 +/- 34.0406	B:hrp + AC	=	-13.3429 +/- 24.0559
C:temp	=	70.2143 +/- 48.1406	C:temp	=	94.2714 +/- 34.0202
AB	=	-154.479 +/- 58.96	AB	=	47.1286 +/- 41.6661
block	=	-250.29 +/- 68.0811	block	=	-239.462 +/- 48.1118
block	=	-155.557 +/- 68.0811	block	=	-156.995 +/- 48.1118
block	=	-32.3905 +/- 68.0811	block	=	-35.9286 +/- 48.1118
block	=	115.343 +/- 68.0811	block	=	109.071 +/- 48.1118
block	=	268.71 +/- 68.0811	block	=	248.071 +/- 48.1118
block	=	378.943 +/- 68.0811	block	=	370.238 +/- 48.1118

Annexe 13: Calcul des valeurs numériques expérimentales prises par  $\alpha$  non codé.

		PDAO	HRP
Niveau haut :	( + 1)	10	0,1
Niveau médian :	( 0)	5,5	0,055
Niveau bas :	( - 1)	1	0,01

Formules générales :

Calcul de  $-\alpha_{\text{non codé}}$ :  $(0) - (-1) = X$   
 $X \cdot (\alpha_{\text{codé}} - 1) = Y$   
 $Y - (-1) = -\alpha_{\text{non codé}}$

Calcul de  $+\alpha_{\text{non codé}}$ :  $(+ 1) - 0 = Z$   
 $Z \cdot (\alpha_{\text{codé}} - 1) = W$   
 $(+ 1) + W = +\alpha_{\text{non codé}}$

Valeurs de PDAO :

Calcul de  $-\alpha_{\text{non codé}}$ :  $5,5 - 1 = 4,5$   
 $4,5 \times 0,414 = 1,863$   
 $1,863 - 1 = 0,863$       **soit  $-\alpha_{\text{non codé}} = 0,863$**

Calcul de  $+\alpha_{\text{non codé}}$ :  $10 - 5,5 = 4,5$   
 $4,5 \times 0,414 = 1,863$   
 $10 + 1,863 = 11,863$       **soit  $+\alpha_{\text{non codé}} = 11,863$**

Valeurs de HRP :

Calcul de  $-\alpha_{\text{non codé}}$ :  $0,055 - 0,01 = 0,045$   
 $0,045 \times 0,414 = 0,01863$   
 $0,01863 - 0,01 = 0,00863$       **soit  $-\alpha_{\text{non codé}} = 0,00863$**

Calcul de  $+\alpha_{\text{non codé}}$ :  $0,1 - 0,055 = 0,045$   
 $0,045 \times 0,414 = 0,01863$   
 $0,1 + 0,01863 = 0,11863$       **soit  $+\alpha_{\text{non codé}} = 0,11863$**

**Annexe 14 : Résultats du PCC : lecture à 30 minutes de cinétique.**

Run	pdac	hfp	ppm_2	ppm_5	ppm_10	ppm_30	Plaque
1	5.500	5.50000E-2	2.61000E-1	4.13000E-1	4.84000E-1	0.562	12
2	5.500	8.63000E-3	3.11000E-1	3.42000E-1	4.21000E-1	0.457	11
3	5.500	1.18830E-1	-2.82000E-1	-9.60000E-2	-1.20000E-2	-0.134	01
4	1.000	1.00000E-1	2.20000E-2	1.09000E-1	1.94000E-1	0.265	07
5	11.863	5.50000E-2	1.10000E-1	2.54000E-1	3.58000E-1	0.466	04
6	5.500	5.50000E-2	4.01000E-1	4.62000E-1	5.39000E-1	0.563	09
7	10.000	1.00000E-2	2.50000E-1	3.80000E-1	4.70000E-1	0.556	08
8	0.963	5.50000E-2	5.60000E-2	2.20000E-2	1.44000E-1	0.178	03
9	10.000	1.00000E-1	6.60000E-2	2.77000E-1	4.29000E-1	0.551	05
10	1.000	1.00000E-2	3.94000E-1	3.28000E-1	3.95000E-1	0.387	10
11	5.500	5.50000E-2	3.68000E-1	5.11000E-1	5.63000E-1	0.596	13

**Annexe 15:** Estimation des effets du PCC : lecture à 30 minutes de cinétique.

-----			-----		
Estimated effects for ppm_2			Estimated effects for ppm_5		
average =	0.290189	+/- 0.0953763	average =	0.154083	+/- 0.0638562
A:pdoa =	0.0586016	+/- 0.0480187	A:pdoa =	0.141878	+/- 0.0321494
B:hrp =	2.94916	+/- 4.80187	B:hrp =	6.45121	+/- 3.21494
AB =	0.464198	+/- 0.361417	AB =	0.28642	+/- 0.241975
AA =	-7.57936E-3	+/- 3.51579E-3	AA =	-0.0110024	+/- 2.35389E-3
BB =	-117.942	+/- 35.1579	BB =	-116.851	+/- 23.5389

Standard error estimated from pure error with 2 d.f. (t = 4.30265)

-----			-----		
Estimated effects for ppm_10			Estimated effects for ppm_30		
average =	0.253908	+/- 0.0527804	average =	0.247531	+/- 0.0252137
A:pdoa =	0.117874	+/- 0.0265731	A:pdoa =	0.0965447	+/- 0.0126942
B:hrp =	6.06546	+/- 2.65731	B:hrp =	11.097	+/- 1.26942
AB =	0.395062	+/- 0.200005	AB =	0.288889	+/- 0.0955442
AA =	-9.04855E-3	+/- 1.94561E-3	AA =	-5.53005E-3	+/- 9.29434E-4
BB =	-113.965	+/- 19.4561	BB =	-156.547	+/- 9.29434

Standard error estimated from pure error with 2 d.f. (t = 4.30265)

**Annexe 16 : Analyse de la variance du PCC : lecture à 30 minutes de cinétique.**

ANOVA for ppm\_2

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	P-value
A:pdoa	.0079775	1	.0079775	1.49	.3467
B:hrp	.0020204	1	.0020204	.38	.5375
AB	.0088360	1	.0088360	1.65	.2277
AA	.0248935	1	.0248935	4.65	.1839
BB	.0602776	1	.0602776	11.25	.0785
Lack-of-fit	.0756734	3	.0252245	4.71	.1301
Pure error	.0107127	2	.0053563		
Total (corr.)	.43023491	10			

R-squared = 0.799212

ANOVA for ppm\_5

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	P-value
A:pdoa	.0467601	1	.0467601	19.48	.0477
B:hrp	.0096678	1	.0096678	4.03	.1826
AB	.0033640	1	.0033640	1.40	.3582
AA	.0524560	1	.0524560	21.85	.0429
BB	.0591679	1	.0591679	24.64	.0383
Lack-of-fit	.0983144	3	.0327715	13.65	.0690
Pure error	.0048020	2	.0024010		
Total (corr.)	.35465673	10			

R-squared = 0.70925

ANOVA for ppm\_10

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	P-value
A:pdoa	.0322761	1	.0322761	19.68	.0472
B:hrp	.0085462	1	.0085462	5.21	.1499
AB	.0064000	1	.0064000	3.90	.1869
AA	.0354796	1	.0354796	21.63	.0433
BB	.0562808	1	.0562808	34.31	.0279
Lack-of-fit	.0920718	3	.0306906	18.71	.0512
Pure error	.0032807	2	.0016403		
Total (corr.)	.32297618	10			

R-squared = 0.704769

ANOVA for ppm\_30

Effect	Sum of Squares	DF	Mean Sq.	F-Ratio	P-value
A:pdoa	.0216523	1	.0216523	57.84	.0169
B:hrp	.0286061	1	.0286061	76.42	.0128
AB	.0034222	1	.0034222	9.14	.0942
AA	.0132520	1	.0132520	35.40	.0271
BB	.1061961	1	.1061961	283.69	.0035
Lack-of-fit	.1704340	3	.0568120	151.77	.0066
Pure error	.0007487	2	.0003743		
Total (corr.)	.49860418	10			

R-squared = 0.656672

**Annexe 17 : Coefficients de régression et équations des résultats du PCC : lecture à 30 minutes de cinétique.**

Regression coeffs. for ppm\_2

```

-----
constant = 0.290189
A:pdoa = 0.0293008
B:hrp = 1.47458
AB = 0.232099
AA = -3.78968E-3
BB = -58.9709
-----
    
```

$$Z = 0,290 + 0,029 X + 1,474 Y - 3,789 \cdot 10^{-3} X^2 - 58,971 Y^2 + 0,232 XY$$

Regression coeffs. for ppm\_5

```

-----
constant = 0.154083
A:pdoa = 0.0709389
B:hrp = 3.2256
AB = 0.14321
AA = -5.50119E-3
BB = -58.4255
-----
    
```

$$Z = 0,154 + 0,071 X + 3,225 Y - 5,501 \cdot 10^{-3} X^2 - 58,435 Y^2 + 0,143 XY$$

Regression coeffs. for ppm\_10

```

-----
constant = 0.253908
A:pdoa = 0.0589369
B:hrp = 3.03277
AB = 0.197531
AA = -4.52428E-3
BB = -56.9823
-----
    
```

$$Z = 0,254 + 0,059 X + 3,032 Y - 4,524 \cdot 10^{-3} X^2 - 56,982 Y^2 + 0,197 XY$$

Regression coeffs. for ppm\_30

```

-----
constant = 0.247531
A:pdoa = 0.0482724
B:hrp = 5.5485
AB = 0.144444
AA = -2.76503E-3
BB = -78.2733
-----
    
```

$$Z = 0,247 + 0,048 X + 5,548 Y - 2,765 \cdot 10^{-3} X^2 - 78,273 Y^2 + 0,144 XY$$



**Annexe 18 : Résultats obtenus par le test T de Student : Incidence du mélange des enzymes.**

Two-Sample Analysis Results			
	Dissoçié	Mélange	Pooled
Sample Statistics: Number of Obs.	8	8	16
Average	0.14525	0.13575	0.1405
Variance	9.19286E-5	8.56429E-5	8.87857E-5
Std. Deviation	9.58794E-3	9.25434E-3	9.42262E-3
Median	0.144	0.1355	0.138
Difference between Means = 9.5E-3			
Conf. Interval For Diff. in Means:	95	Percent	
(Equal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-6.07302E-4	0.0196073	14 D.F.
(Unequal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-6.08491E-4	0.0196085	14.0 D.F.
Ratio of Variances = 1.07339			
Conf. Interval for Ratio of Variances:	0	Percent	
Sample 1 ÷ Sample 2			
Hypothesis Test for H0: Diff = 0		Computed t statistic = 2.01642	
vs Alt: NE		Sig. Level = 0.0633597	
at Alpha = 0.05		so do not reject H0.	

**INDEX DES  
FIGURES ET TABLEAUX**

## INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### FIGURES

**Figure n°1** : Formation de l'histamine.

**Figure n°2** : Processus général de formation de l'histamine, putrescine, cadavérine, spermine, spermidine et agmatine attribué à l'action enzymatique bactérienne (d'après Karmas and Mietz, 1978).

**Figure n°3** : Les mécanismes de défense contre l'histamine intraluminale (d'après Moneret-Vautrin, 1990).

**Figure n°4** : Plaque de Chromatographie sur couche mince – Conservation des échantillons à 30°C : la tache d'histidine disparaît alors que celle d'histamine se développe (d'après Nerisson, 1975).

**Figure n°5** : Formation d'un composé fluorophore – Dosage de l'histamine par la méthode fluorimétrique (d'après Chauchaix et Pailler, 1980).

**Figure n°6** : Les protéines constitutives du muscle de poisson (d'après Le Roux, 1982).

**Figure n°7** : Principales modifications intervenant dans les tissus musculaires après la mort de l'animal (d'après Cheftel, 1989).

**Figure n°8** : Le thon Germon (*Thunnus alalunga*) (PDM n°9, Sept. Oct. 1991 – Source FIOM)

**Figure n°9** : Débarquement des thoniers français par espèces (en tonnes – Source CCPM).

**Figure n°10** : Spectrophotomètre type lecteur de plaques.

**Figure n°11** : Equipement CLHP.

**Figure n°12** : Principe du dosage enzymatique de l'histamine (Lerke and coll., 1983).

**Figure n°13** : Spectre d'absorption de l'histamine dans les conditions du dosage.

**Figure n°14** : Courbes représentant l'évolution de la densité optique en fonction du temps – Lecture au spectrophotomètre à 550 nm.

**Figure n°15** : Courbes représentant l'évolution de la densité optique en fonction de la concentration en histamine – Lecture au spectrophotomètre à 550 nm.

**Figure n°16** : Protocole d'extraction au TCA, de l'histamine dans le poisson.

**Figure n°17** : Protocole d'extraction au Tampon, de l'histamine dans le poisson.

**Figure n°18** : Résultats fournis par le micro-dosage des protéines par la méthode de Lowry.

**Figure n°19** : Lecture après 30 min. de cinétique des réactions colorimétriques des différentes extractions à l'eau, au TCA et au tampon, avec ou sans chauffage à 80°C.

**Figure n°20** : Electrophorèse des différentes extractions.

**Figure n°21** : Protocole d'extraction de l'histamine retenue : Extraction aqueuse.

**Figure n°22** : Protocole d'extraction aqueuse de l'histamine dans le poisson. Vérification du caractère quantitatif par CLHP.

**Figure n°23** : Courbes comparées des densités optiques des gammes d'histamine, en fonction du solvant utilisé (30 min.).

**Figure n°24** : Représentation schématique d'un système expérimental (D'après Courcoux, 1991).

**Figure n°25** : Influence de la température sur l'intensité de la coloration, lors de la réaction enzymo-colorimétrique.

**Figure n°26** : Evolution de la coloration développée, en fonction du temps.

**Figure n°27** : Résultats expérimentaux exprimés en fonction des résultats théoriques. Linéarité du modèle. Exemples à 5 et à 30 ppm.

**Figure n°28** : Disposition des points expérimentaux d'un plan complet  $2^2$  - Formation d'un hypercube (D'après Goupy, 1990).

**Figure n°29** : Disposition des points expérimentaux d'un plan complet  $2^2$  (cercles noirs) et des essais du plan en étoile associé (carrés blancs), (D'après Goupy, 1990).

**Figure n°30** : Graphes des surfaces de réponses du PCC.

**Figure n°31** : Graphes des contours des surfaces de réponses du PCC.

**Figure n°32** : Superposition des graphes des contours des surfaces de réponses du PCC.

**Figure n°33** : Dosage enzymatique de l'histamine.

**Figure n°34** : .Etude comparative des méthodes Enzymatique et CLHP.

**Figure n°35** : .Dosage de l'histamine dans un extrait de thon - Gamme étalon.

**Figure n°36** : .Etude des interférences de l'agmatine, la putrescine et la cadavérine, sur le dosage enzymatique de l'histamine.

**Figure n°37** : Etude comparative des utilisations de réactifs en mélange et individuellement.

**Figure n°38** : Incidence de la lyophilisation des enzymes, sur la réaction enzymo-colorimétrique.

**Figure n°39** : Plaquette publicitaire Sigma : réactifs en comprimés.

## TABLEAUX

**Tableau n°1** : Consommation des produits de la mer . Données 1990 (D'après Karpinski, 1990 - CETEVIC, Source FIOM).

**Tableau n°2** : Evolution du marché des produits de la mer surgelés entre 1985 et 1990. (D'après Renard, 1991, Source SECODIP).

**Tableau n°3** : Evolution du commerce extérieur français des produits de la mer. (PDM n°6, Mars-Avril 1991 - Source FIOM)

**Tableau n°4** : Production d'histamine et activité de l'histidine décarboxylase de quelques souches bactériennes (traduit d'après Ferencik, 1970).

**Tableau n°5** : Histamine contenue dans différentes parties de Listao incubé 24 h à des températures variables (traduit d'après Franck and coll., 1981).

**Tableau n°6** : Teneurs en amines biogènes du poisson frais (mg/100g), en fonction des conditions de stockage sous CO<sub>2</sub> (d'après Watts and Brown, 1982).

**Tableau n°7** : Teneur en histamine de différents organismes (d'après Billon, 1978).

**Tableau n°8** : Teneur en histamine (mg/Kg) des aliments frais (Bibliographie comparée).

**Tableau n°9** : Teneur en histamine du poisson (mg/Kg) (d'après Quevauviller, 1965 et Moneret-Vautrin, 1990).

**Tableau n°10** : Teneurs comparées en amines biogènes (mg/Kg) des produits frais (Bibliographie comparée).

**Tableau n°11** : Evolution des taux d'amines biogènes (mg/Kg) rencontrées dans la viande de porc selon sa présentation (traduit d'après Lakritz, 1975).

**Tableau n°12** : Valeurs moyennes des teneurs en histamine (mg/Kg) des espèces de poisson étudiées,, en fonction de la température de stockage (traduit d'après Edmunds and Eitenmiller, 1975).

**Tableau n°13** : Teneurs en histamine et en histidine (mg/100g) dans du hareng stocké à 2°C (traduit d'après Dabrowski, 1968).

**Tableau n°14** : Tableau synoptique des méthodes de dosage de l'histamine.

**Tableau n°15** : Exemples de dosages de l'histamine par CCM (D'après Chauchaix et Pailler, 1980).

**Tableau n°16** : Variation de la teneur en matière grasse, en % des muscles (d'après Piclet, 1980).

**Tableau n°17** : Caractéristiques des réactifs du dosage.

**Tableau n°18** : Diamine oxydase : 1-4-3-6 (D'après Barman, 1969).

**Tableau n°19** : Volumes des réactifs.

**Tableau n°20** : Evolution des densités optiques de la gamme d'histamine après extraction au TCA (pH = 1,2) – Coloration blanchâtre.

**Tableau n°21** : Cinétique d'évolution de la densité optique, dans la cupule représentant le blanc, malgré l'absence de coloration. Extraction au tampon pH=6,8.

**Tableau n°22** : Bilan des essais d'extraction.

**Tableau n°23** : Dosage des protéines totales dans les extraits de poisson. Méthode de Biuret.

**Tableau n°24** : Dosage des protéines totales – Méthode de Lowry – dans les différents extraits eau, TCA et tampon, avec ou sans chauffage du broyât.

**Tableau n°25** : Cinétique d'évolution de la densité optique dans la cupule représentant le blanc malgré l'absence de coloration – méthode d'extraction retenue.

**Tableau n°26** : Vérification de l'extraction aqueuse de l'histamine, par CLHP.

**Tableau n°27** : Valeurs des pH des solutions de la gamme étalon d'histamine solubilisée dans l'eau.

**Tableau n°28** : Valeurs numériques des paramètres utilisés lors de la détermination de l'erreur expérimentale.

**Tableau n°29** : Schéma de la plaque – Disposition des solutions sur 8 ou 4 cupules – Manipulation de détermination de l'erreur expérimentale.

**Tableau n°30** : Valeurs numériques des densités optiques obtenues lors de la détermination de l'erreur expérimentale.

**Tableau n°31** : Expression de la répétabilité.

**Tableau n°32** : Détermination de l'effet jour – Test de Fischer.

**Tableau n°33** : Représentation de la matrice des effets du PFF  $2^{4-1}$ .

**Tableau n°34** : Caractéristiques des séries d'expériences réalisées aux points centraux.

**Tableau n°35** : Matrice complète du PFF  $2^{4-1}$  et de ses points centraux.

**Tableau n°36** : Domaine expérimental du PFF  $2^{4-1}$

**Tableau n°37** : Matrice du PFC  $2^2$ , selon l'ordre de Yates.

**Tableau n°38** : Domaine expérimental du PFC  $2^2$ .

**Tableau n°39** : Matrice d'expérience, induite par le plan en étoile du PFC  $2^2$ .

**Tableau n°40** : Domaine expérimental du plan en étoile.

**Tableau n°41** : Matrice complète des effets du PCC.

**Tableau n°42** : Domaine expérimental retenu après optimisation du dosage.

**Tableau n°43** : Etude comparative des méthodes CLHP et enzymatique

**Tableau n°44** : Réactivité des Amines biogènes et dérivés, à la PDAO.

**Tableau n°45** : Expression de la répétabilité.

**Tableau n°46** : Test de reproductibilité intersérielle intralaboratoire.

**Tableau n°47** : Etude financière (Sept. 1992) – Investissements.

**Tableau n°48** : Etude financière (Sept. 1992) – Consommables.

**Tableau n°49** : Coût global d'une analyse réalisée en double.

RAPPORTS INTERNES DRV 1992

N°RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUS	NB PAGES	TIRAGE
92-001	DRV/RA DRV/SEM	PMDC/BREST PARIS	J.C.DAO, P.G.FLEURY PH.PAQUOTTE	ELEMENTS DE REFLEXION POUR L'EVALUATION ECONOMIQUE DE LA FILIERE COQUILLE ST JACQUES	Nov-91	LIBRE	60	100
92-002	DRV/RA	PMDC/BREST	J.C.DAO, X.CASEY	RADE DE BREST 1989-1990 FIXATION DU NAISSAIN DE PECTINIDES SUR LES COLLECTEURS EXPERIMENTAUX	Déc-91	LIBRE	40	100
92-003	DRV/RA	PMDC/BREST	N.BAILLON	ANALYSE DES STRIES DE CROISSANCE DES POST-LARVES DE ( PECTEN MAXIMUS)	Déc-91		47	100
92-004	DRV/RA DEL	CREMA DEL/BREST	HUSSENOT M.KEMPF	AQUACULTURE ET ENVIRONNEMENT SEMINAIRE 18/22 NOVEMBRE 1991,	Jan-92	LIBRE	31	20
92-005	DRV/RA	PMDC/BREST	R.ROBERT,G.TRUT M.BOREL, D.MAURER	GROWTH, FATNESS AND GROSS BIOCHEMICAL COMPOSITION OF THE JAPANESE OYSTER CRASSOSTREA GIGAS IN STANWAY CYLINDERS IN THE BAY OF ARCACHON, FRANCE	Fév-92	LIBRE	21	
92-006	DRV/VP	GENIE ALIMENTAIRE	M.CARDINAL J.CORNET ET AL.	QUALITE DE LA CHAIR DE LA TRUITE FARIO	Jan-92	RESTR	19	
92-007	DRV/RH	PORT EN BESSIN	G.PAULMIER	CATALOGUE ILLUSTRE DES MICROPHYTES PLANCTONIQUES *ET BENTHIQUES DES CÔTES NORMANDES	Mar-92	LIBRE	71	
92-008	DRV/RH	NANTES	H.BEUCHER	LOGICIELS DE DYNAMIQUE DES POPULATIONS	Mai-92	LIBRE	95	40
92-009	DRV/RH	NANTES	G.ARZUL,F.ROGER .E.ERARD-LE-DENN ET AL.	SURVEILLANCE ECOLOGIQUE ET HALIEUTIQUE DE L'ENVIRONNEMENT MARIN DU SITE DE LA CENTRALE DE PENLY (MANCHE EST)	Mai-92	RESTR	105	30
92-010	DRV/RA	PORT EN BESSIN	H.JEANERET J.KOPP,J.P.JOLY ET AL.	L'OSTREICULTURE SUR LA CÔTE EST DU COTENTIN	Sep-92	LIBRE	64	150



RAPPORTS INTERNES DRV 1992

N°RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUS	NB PAGES	TIRAGE
92-011	DRVIRA	LA TREMBLADE	A.GERARD J.M.PEIGNON ET AL	OBTENTION DE SOUCHES CONCHYLICOLES PERFORMANTES PAR POLYPLOIDISATION	Aoû-92	RESTR	36	20
92-012	DRVIRA	LA TREMBLADE	O.RAILLARD P.SOLETCHNIK ET AL	MODELISATION DE L'ECOSYSTEME DU BASSIN DE MARENNES-OLERON	Jun-92		261	
92-013	DRVIRA	L'HOUMEAU	M.J.DARDIGNAC	LA MYTILICULTURE DANS LE PERTUIS BRETON	Déc-92	LIBRE	31	
92-014	DRVIRA	LA TREMBLADE	A.BODOY J.GARNIER S.HEURTEBISE	LES POSSIBILITES D'ELEVAGE DU PETONCLE NOIR CHLAMYS VARIA, DANS LES MARAIS MARITIMES DE LA REGION POITOU-CHARENTES	Sep-92		26	
92-015	DRVIRA	CREMA L'HOUMEAU	J.HUSSENOT ET AL.	STIMULATION DE LA PRODUCTIVITE NATURELLE PAR ENRICHISSEMENTS MINERAUX ET ORGANIQUES	Nov-92	LIBRE	97	100
92-016	DRVIRA	CAYENNE	J.M.GRIESSINGER ET AL.	AMELIORATION DES TECHNIQUES D'ELEVAGE DE LA CHEVRETTE MACROBRACHIUM ROSENBERGII EN GUYANE	Oct-92	LIBRE	85	
92-017	DRVIRA	PMDC/BREST	J.BARRET	ESSAI DE TRAITEMENT DU SEDIMENT CONTRE LE VIBRIO P1 LORS D'UN DEMI-ELEVAGE DE PALOURDES	Avr-92	LIBRE	34	100
92-018	DRVIRH	LA ROCHELLE L'HOUMEAU	J.C.QUERO, P.ARZEL et AL	LES ALGUES ET INVERTEBRES MARINS DES PECHEES FRANCAISES	Jun-92		392	75
92-019	DRVIRH	SETE	A.CAMPILLO J.L.BIGOT	LES PECHERIES FRANCAISES DE MEDITERRANEE : SYNTHESE DES CONNAISSANCES	Aoû-92		206	
92-020	DRVIRA	COP/TAHITI	T.RENAULT E.THOUARD M.WEPPE	MORTALITES MASSIVES EN ELEVAGE LARVAIRE DE LATES CALCARIFER	Déc-92		43	20
92-021	DRVIRA	PALAVAS	D.COATANEVA J.OHEIX ET AL.	ESSAIS DE TELECAPTAGE DE L'HUITRE PLATE OSTREA EDULIS EN MEDITERRANEE	Déc-92	LIBRE	62	40

RAPPORTS INTERNES DRV 1992

N°RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUS	NB PAGES	TIRAGE
92-022	DRVIRA	LA TRINITE	C. LE BEC J. MAZURIE	L'HUITRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS EN BRETAGNE (SUIVI 1990)	Déc-92	LIBRE	34	
92-023	DRVIRA	LA TRINITE	C. LE BEC J. MAZURIE	L'HUITRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS EN BRETAGNE (SUIVI 1991)	Déc-92	LIBRE	37	
92-024	DRVIRH	SETE	C. BENE	LA GESTION DES RESSOURCES INSTABLES	Oct-92	LIBRE	49	

RAPPORTS INTERNES DRV 1993

N°RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUS	NB PAGES	TIRAGE
93-001	DRV/RH	RH/LE ROBERT ECOHAL/L'HOUME AU	G.PAULMIER	CRUSTACES PROFONDS CAPTURES AUX CASSIERS AUX ANTILLES FRANCAISES	Fév-93	Libre	34	30
93-002	DRV/RA DRV/SEM	PMDC/BREST SEM./PARIS	P.G.FLEURY P.PAQUOTTE	EVALUATION ECONOMIQUE DE LA DIVERSIFICATION EN COQUILLE ST JACQUES D'UNE ENTREPRISE CONCHYLICOLE EN MER OUVERTE	Fév-93	Libre	21	150
93-003	DRV/RH	RH SETE	J.DUCLERC J.BERTRAND	VARIABILITE SPATIALE ET TEMPORELLE D'UNE PECHERIE AU FILET DANS LE GOLFE DU LION. ESSAI D'EVALUATION DE L'IMPACT D'UN RECIF ARTIFICIEL.	Fév-93	Libre	42	?
93-004	DRV/VP	VP/NANTES	M.ETIENNE; M.DARZACQ; J.NOEL; A.DANIEL	QUALITE DU THON APPERTISE. CRITERES PHYSICO-CHIMIQUES	Mar-93	Libre	72	?
93-005	DRV/VP	VP/NANTES	N.BREGEON	DOSAGE RAPIDE DE L'HISTAMINE DANS LE THON : MISE AU POINT, OPTIMISATION, APPLICATION	Mar-93	Restreint	61	?

# DOSAGE RAPIDE DE L'HISTAMINE DANS LE THON MISE AU POINT - OPTIMISATION - APPLICATIONS

par Nelly BREGEON

## RESUME

La présence d'une forte quantité d'histamine dans le thon (>100 mg/Kg) entraîne, après ingestion, un risque d'intoxication de type pseudo-allergique. Sa teneur en est donc réglementée dans les produits de la mer et les industriels de la transformation doivent s'y conformer. Une cotation organoleptique ne laisse pas préjuger du degré de contamination et l'histamine est thermorésistante. Il s'avère donc préférable d'effectuer les dosages sur la matière première avant transformation, plutôt que sur le produit fini à plus forte valeur ajoutée. L'objectif de l'étude est de transposer une méthode enzymatique utilisant un spectrophotomètre, à un appareil multifonctions : lecteur de plaques. L'optimisation est réalisée grâce à un outil mathématique puissant : les plans expérimentaux. La réaction enzymatique repose sur l'utilisation d'un système enzymatique à double pas, ayant l'histamine pour substrat initial. Préalablement au dosage, l'histamine est extraite à l'eau, après broyage, chauffage, filtration et ajustement du pH, l'échantillon développe, en présence des réactifs enzymatiques, une coloration dont l'intensité, proportionnelle à la charge histaminique de l'échantillon est appréciée par lecture de densité optique après 30 min. à 37°C. Les résultats de l'étude montrent que la méthode n'est pas spécifique de l'histamine strictement, mais sélective pour trois autres amines : putrescine, cadavérine et agmatine. Heureusement, ces molécules ne peuvent interférer que dans du thon en état d'altération avancé. Elle dévoile que le modèle étudié est non linéaire et que l'optimisation retenue n'est utilisable que pour des échantillons de contamination histaminique inférieure à 300 mg/Kg. Son exactitude est prouvée, par comparaison à une méthode considérée comme référence : la chromatographie liquide haute performance. Enfin, elle ouvre des possibilités d'extension vers une manipulation plus simplifiée, présentée sous forme de kit terrain à usage unique, ne nécessitant pas d'appareil de lecture, mais appréciable visuellement par comparaison à une gamme d'étalonnage.

**Mots-clés :** Thon - Histamine - Plans expérimentaux - Dosage enzymatique - Colorimétrie - Test rapide.

## A QUICK QUANTITATIVE ANALYSIS OF HISTAMINE IN TUNA OPTIMISATION - APPLICATIONS

by Nelly BREGEON

## ABSTRACT

High quantities of histamine in tuna (>100 ppm) can cause pseudo-allergic poisoning after consumption. Its level is controlled by regulations for seafood products, hence the processing industry must take steps to conform with them. Sensory evaluation does not allow the degree of contamination to be accurately determined and histamine is heat resistant. It is, therefore, preferable to carry out quantitative analysis on the raw material before processing rather than on the high value added finished product. This study's objective is to adapt an enzymatic analysis, using a spectrophotometer, to a multi-function microplate reader. The optimisation has been realised by performing mathematical procedures : Experimental design methods. The enzymatic reaction involves a two step enzymatic system with histamine acting as the initial substrate. Before analysis, histamine is water extracted from raw or cooked tuna using grinding, heating, filtration and pH adjustment. The sample developed a blue colour on addition of the enzymatic reagents. The absorbance intensity, proportional to histamine content, is read after 30 min. at 37°C. The results show that this method isn't specific to histamine, however, it proves to be selective for just three other amines : putrescine, cadaverine and agmatine. Fortunately, these three molecules only interfere with tuna in an advanced state of decomposition. This study shows that the model is non linear, but that the method is applicable on samples of histamine contents up to 300 mg/kg. The methods precision is checked by comparison with an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) method regarded as reference. There are possibilities for simplification of the method, a single use Kit using visual comparison to standards (rather than a spectrophotometer) is entirely plausible.

**Key words :** Tuna - Histamine - Experimental design method - Enzymatic analysis - Spectrophotometry - Quick test.

Présenté en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur CNAM - Sciences et techniques des industries Agro-Alimentaires - Le 4 Nov. 1992.



Siège social 155, rue Jean-Jacques Rousseau 92188 Issy-les-Moulineaux Cedex  
Tél. 46 48 22 060  
Fél. 46 48 21 060